UNIVERSITE DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1970 — N° 608

SUR LES PROPRIÉTÉS TÉRATOGÈNES DE L'HYDROXYURÉE, DE LA SEMICARBAZIDE ET DE SUBSTANCES APPARENTÉES, ÉTUDIÉES CHEZ L'EMBRYON DE POULET

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Université)

PAR

FRANÇOISE GUILLET

PHARMACIEN

EX-ASSISTANTE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DIPLÔMÉE DES CERTIFICATS D'ÉTUDES SPÉCIALES DE SÉROLOGIE ET D'HÉMATOLOGIE

née à Cognac (Charente), le 25 septembre 1937

soutenue publiquement le 18 décembre 1970

Examinateurs de la thèse :

MM. STOLL, Professeur ..... *Président.*

BABIN, Professeur .....

CANELLAS, Professeur ..... *Juges.*

MARAUD, Professeur .....

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547320_0007

UNIVERSITE DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1970 — N° 608

SUR LES PROPRIÉTÉS TÉRATOGÈNES DE L'HYDROXYURÉE, DE LA SEMICARBAZIDE ET DE SUBSTANCES APPARENTÉES, ÉTUDIÉES CHEZ L'EMBRYON DE POULET

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Université)

PAR

FRANÇOISE GUILLET

PHARMACIEN

EX-ASSISTANTE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DIPLÔMÉE DES CERTIFICATS D'ÉTUDES SPÉCIALES DE SÉROLOGIE ET D'HÉMATOLOGIE

née à Cognac (Charente), le 25 septembre 1937

soutenue publiquement le 18 décembre 1970

Examinateurs de la thèse :

MM. STOLL, Professeur ..... *Président.*

BABIN, Professeur .....

CANELLAS, Professeur ..... *Juges.*

MARAUD, Professeur .....

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mon mari

A mon fils

A mes parents

A mon Président de Thèse

Monsieur le Professeur R. STOLL

Professeur de Biologie et d'Histologie

Docteur ès-Sciences

Biologiste des Hôpitaux, Chef de Service

Médaille de Vermeil du service de Santé des Armées

En remerciements d'avoir bien voulu me sacrifier une grande part de ses occupations pour me guider dans ce travail.

A mes Juges

Monsieur le Professeur R. BABIN
Professeur de Pharmacie chimique
Docteur ès-Sciences
Chef du département de Biochimie de la Fondation Bergonié
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier des Palmes Académiques

Monsieur le Professeur J. CANELLAS
Professeur de Pharmacodynamie et Hydrologie
Licencié ès-Sciences
Officier des Palmes Académiques

Monsieur le Professeur R. MARAUD
Professeur titulaire (T.P.) d'Histologie et d'Embryologie
Docteur ès-Sciences
Chevalier des Palmes Académiques

Pour l'enseignement et le bon accueil
qu'ils m'ont toujours prodigués.

A Monsieur le Professeur COLLETER

Pour l'obligeance qu'il a manifestée
à mon égard lorsque j'ai fait appel
à ses connaissances.

A Monsieur CASTETS

Directeur du Centre Hospitalier d'AGEN

dont la bienveillance m'a permis de

mener à bien ce travail.

Aux Membres du Laboratoire de Biologie

et d'Histologie.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I. - MATERIEL ET METHODES 13

CHAPITRE II. - SUR L'ACTION TERATOGENE DE L'HYDROXYUREE, DE LA SEMICARBAZIDE ET DES SUBSTANCES APPARENTEES 19

1 - Malformations spontanées 21

2 - Action de l'hydroxyurée 22

3 - " de la semicarbazide 33

4 - " de la thiosemicarbazide 40

5 - " de l'hydrazine 41

6 - " de l'hydroxylamine 42

7 - " de l'aminoguanidine 43

8 - " comparée des diverses substances 45

CHAPITRE III. - LE MECANISME D'ACTION TERATOGENE ETUDIE DANS LE CAS DE LA SEMICARBAZIDE 46

1 - L'histamine et la sérotonine interviennent-elles dans l'action tératogène ? 49

2 - La carence en vitamine B.6 intervient-elle ? 52

3 - Action de divers métabolites de l'A.D.N. sur le pouvoir tératogène de la semicarbazide. 55

CHAPITRE IV. - DISCUSSION DES RESULTATS. 57

1 - Le pouvoir tératogène et ses modalités 59

2 - Mode d'action de l'hydroxyurée, de la semicarbazide et de l'hydrazine 62

.../...

3 - Sur le mode d'action de l'hydroxylamine et de l'aminoguanidine..... 66

4 - Considérations sur l'emploi des produits étudiés chez les Mammifères gestants 66

CONCLUSIONS GENERALES 68

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE 72

I N T R O D U C T I O N

Durant ces dernières années, de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de l'action des poisons chimiques sur la cellule animale, particulièrement en vue d'une chimiothérapie du cancer.

Parmi diverses classifications possibles, on peut ranger ces poisons cytostatiques en trois groupes principaux. Le premier comprend les drogues entièrement étrangères à l'organisme, qui bloquent la synthèse d'un constituant cellulaire, indispensable à la vie cellulaire, en particulier des acides désoxyribonucléiques (A.D.N.) et qui entraînent de ce fait les troubles cellulaires, en particulier des chromosomes dont l'intégrité est indispensable à la cellule. Le deuxième groupe contient des poisons dits "fusoriaux", tels que la colchicine et ses dérivés qui agissent essentiellement sur la mitose en perturbant l'évolution du fuseau nécessaire à la division cellulaire. Le troisième groupe rassemble les antimétabolites, molécules de structure proche des métabolites normaux tels que les vitamines, les bases puriques ou les acides aminés. Dépourvues des propriétés physiologiques correspondant aux produits qu'elles imitent, ces substances dupent l'organisme et sont assimilées, sans pouvoir jouer le rôle usuel du produit naturel. Leur présence entraîne alors, par substitution, une carence du métabolite normal qui, en dernier ressort, déclenche des troubles cellulaires consécutifs par exemple à un arrêt de la synthèse des A.D.N., ou à des lésions chromosomiques comme le font les substances du premier groupe. On voit, au passage, la précarité d'une classification qui se voudrait rationnelle (KIHLMAN, 1966 ; TERROINE, 1966).

.../...

Chaque année apparaissent de nouvelles substances appartenant à l'un ou l'autre de ces groupes et dont l'activité est explorée soit sur les cellules cancéreuses elles-mêmes pour tester une action thérapeutique éventuelle, soit sur les cellules normales pour poser les bases de leur mode d'action. Du fait de leur action cytotoxique, ces produits peuvent également susciter des lésions des cellules embryonnaires, considération généralement assez négligée, mais dont la connaissance est utile, tant pour éclairer cet aspect particulier du mode d'action biologique de ces drogues, que pour se prémunir contre la genèse éventuelle de malformations lorsqu'elles sont administrées intempestivement à la mère gestante, et qu'elles présentent une activité tératogène.

Parmi ces poisons cytologiques étudiés depuis relativement peu de temps, figurent certains corps apparentés à l'urée. Catabolite physiologique de l'organisme, l'urée présente de discrètes propriétés cytotoxiques connues depuis longtemps.

Récemment ce produit a donné naissance à des dérivés comprenant en particulier l'hydroxyurée, molécule simple qui révèle une activité particulièrement intéressante dans la thérapeutique de certaines formes de leucémies humaines ou animales. Cette dernière substance s'apparente par sa constitution à la semicarbazide et aussi à l'hydroxylamine qui serait selon certains le métabolite actif de l'hydroxyurée.

Comme ces substances ont en particulier la propriété d'agir dans le métabolisme des amines biogènes, nous avons étudié concurremment l'aminoguanidine et l'hydrazine qui présentent sur ce point une parenté d'action avec les produits précédents.

..../...

T A B L E A U I

FORMULE CHIMIQUE DES SUBSTANCES ETUDIEES

HYDROXYUREE

SEMICARBAZIDE

HYDRAZINE

THIOSEMICARBAZIDE

HYDROXYLAMINE

AMINOGUANIDINE

.../...

Par contre, l'étude de l'influence de ces mêmes substances sur le développement embryonnaire n'a pas été réalisée d'une façon approfondie et comparative.

Notre travail vise à apporter une contribution à l'étude de ce problème tératologique en prenant l'embryon de Poulet comme matériel d'étude. Sans sous-estimer l'intérêt médical qu'il y a à effectuer les études tératologiques sur les Mammifères gestants, il n'est pas douteux que l'embryon d'Oiseaux conserve un intérêt manifeste dans ce domaine. En effet, l'embryon d'Oiseaux, comme celui des Mammifères, appartient au groupe des embryons amniotes dotés des mêmes annexes embryonnaires, de mode d'embryogenèse voisin et d'un mécanisme d'homéothermie analogue. Par ailleurs, le prix de revient de l'embryon d'Oiseau est faible et on a de ce fait la possibilité de réaliser une exploration expérimentale numériquement satisfaisante qui facilite par la suite le passage à l'embryon de Mammifères, dont le comportement tératologique ne s'éloigne que sur très peu de points de celui des embryons d'Oiseaux.

Dans cette introduction destinée à poser les problèmes, nous rapporterons d'abord les travaux antérieurs concernant l'activité des substances indiquées, tant sur les cellules normales ou cancéreuses, que sur les cellules et organes embryonnaires.

Comme nous l'avons dit au passage, l'urée, tête de liste, présente une faible action antimitotique. En effet, à l'échelon morphologique, elle entraîne des anomalies chromosomiques des leucocytes humains ; elle affecte également le fuseau astérien (MAZIA 1961). A l'échelon biochimique, elle inhibe l'incorporation de la thymidine chez le trypanosome (TRAGER, 1964).

.../...

Dans le même ordre d'idée, l'hydroxyurée, dérivée de l'urée, a été étudiée particulièrement sous l'angle d'une action inhibitrice sur la synthèse de l'A.D.N. (YOUNG, SCHOECHETMAN, HODAS et BALIS, 1967). Ce produit, synthétisé pour la première fois par DRESLER et STEIN en 1869, s'est révélé être un produit intéressant et a fait l'objet de travaux visant surtout à comprendre son mode d'action sur la cellule, cancéreuse ou non.

Distribuée rapidement dans tout l'organisme, elle agit essentiellement en inhibant la croissance cellulaire car elle affecte parfois jusqu'à la mort des cellules, la synthèse des acides désoxyribonucléiques, éléments fondamentaux de la constitution chromosomique et supports des mécanismes de l'hérédité (ADAMSON, AGUE, HESS et DAVIDSON, 1965 ; PHILIPS, STERNBERG, SCHWARTZ, CRONIN, SODERGREN et VIDAL, 1967 ; SCHWARTZ, GAROFALO, STERNBERG et PHILIPS, 1965, SINCLAIR, 1967). Elle perturbe ainsi l'incorporation de la thymidine dans les cellules cancéreuses de la souche Héla (YOUNG et HODAS, 1964, PFEIFFER et TOLMACH, 1967). Par ailleurs, l'hydroxyurée affecte également la conversion de l'acide cytidilique en acide désoxycytidilique dans les cellules du Rat et l'incorporation de l'orthophosphate à P. 32 dans l'A.D.N. d'une tumeur de la Souris (YARBRO, KENNEDY et BARNUM, 1965) et des cellules hépatiques du Rat (SCHWARTZ, GAROFALO, STERNBERG et PHILIPS, 1965). Chez l'homme, elle bloque aussi la synthèse des bases pyrimidiques constitutives des A.D.N. avant la formation de l'acide orotique qui en est un des maillons (VOGLER, BAIN et HUGULEY, 1966 ; TURNER, ABRAMS et LIEBERMAN, 1966).

En somme, à l'échelon biochimique, l'hydroxyurée trouble donc diverses étapes de la synthèse des A.D.N. (KRIM, GELBARD et

.../...

PEREZ, 1967), action qui serait surtout marquée par une inhibition affectant la transformation des ribonucléotides en désoxyribonucléotides, processus qui peut être parfois corrigé en administrant ces derniers corps au milieu de culture des cellules (YOUNG, SCHOCHETMAN et KARNOFSKY, 1967).

A l'échelon morphologique, cette action sur les A.D.N. se traduit par des lésions chromosomiques observées dans les leucocytes humains, dans les cellules d'embryons de Souris (BORENFREUND, KRIM et BENDICH, 1964) et dans différents tissus du Rat, tels que la moelle osseuse et les tissus lymphoïdes (PHILIPS, STERNBERG, CRONIN, SODERGREN et VIDAL, 1967). Par contre, l'hydroxyurée n'affecte pas directement la synthèse des acides ribonucléiques (A.R.N) ni celle des protéines cytoplasmiques comme on l'a vu dans les cellules de la souche Hela (YOUNG et HODAS, 1964) et dans la cellule hépatique du Rat (SCHWARTZ, GAROFALO, STERNBERG et PHILIPS, 1965).

Selon certains auteurs, l'action biochimique et morphologique de l'hydroxyurée passerait par l'intermédiaire de l'hydroxylamine, produit de son métabolisme, responsable réel de son activité antimitotique (FISHBEIN et CARBONE, 1963). D'après BORENFREUND, KRIM et BENDICH (1964), l'hydroxylamine elle-même serait transformée en radical nitroxyle (HON) qui serait ensuite dimérisé en acide hyponitreux dont les sels amèneraient des lésions chromosomiques. L'hydroxylamine aurait ainsi un mode d'action analogue à celui que présentent les radiomimétiques sur l'A.D.N. (CLARK, 1963).

Néanmoins, cette interprétation générale prête à la critique car, à l'échelon biochimique, l'hydroxylamine donne parfois

.../...

des résultats différents de ceux que donne l'hydroxyurée. Comme ce dernier produit, elle inhibe les transformations de l'uridine qui fournit la cytidine et la thymidine incorporées dans les A.D.N., mais elle arrête également son intégration dans les A.R.N. et celle de la leucine dans les protéines de la souche Héla, ce que ne fait pas l'hydroxyurée.

A l'échelon morphologique, il en est de même. Si l'hydroxylamine et l'hydroxyurée donnent des anomalies chromosomiques comparables chez l'embryon de Souris et de Hamster (BORENFREUND, KRIM et BENDICH, 1964), par contre, l'hydroxylamine ne modifie pas les chromosomes des leucocytes humains, contrairement à ce que fait l'hydroxyurée (OPPENHEIM et FISHBEIN, 1965). On retrouve également des différences dans le mode d'action de ces substances à l'égard de la bactérie Pseudomonas aeruginosa (GALE, KENDALL, Mc LAIN et DUBOIS, 1964).

En dehors de l'hydroxyurée et de l'hydroxylamine dont nous venons de parler, nous avons également étudié une substance parente des précédentes.

Ainsi, nous avons fait appel à la semicarbazide qui perturbe la croissance cellulaire de l'embryon de Rat (KAHLSON et ROSENGREN, 1959), la pupaison des larves de Scarabée (LEBLANC, BUOT et COURVAUL, 1962), la régénération des membres du Triton (DECK et SHAPIRO, 1963). Elle possède également en combinaison, soit avec le méthylglyoxal, soit avec la sarcomycine, une activité anticarcinogène sur les cellules de tumeurs expérimentales (MIHICH et NICHOL, 1965; BRUNORI, FLORIDI, CAPUTO et GIULANO, 1966). La thiosemicarbazide, qui en est un dérivé soufré, exerce aussi une action inhibitrice sur les tumeurs du Rat.

.../...

Enfin, à titre comparatif, nous avons aussi examiné l'action tératologique de deux substances présentant des parentés d'action avec les précédentes, à savoir l'aminoguanidine et l'hydrazine, cette dernière donnant en particulier des dérivés méthylés étudiés dans la chimiothérapie du cancer.

Le mode d'action de l'hydrazine sur les cellules de l'adulte n'est pas encore bien élucidé. Il se rapproche apparemment de celui de l'hydroxyurée puisqu'il bloque l'incorporation de la thymidine nécessaire aux A.D.N. mais il s'en sépare puisqu'il affecte aussi l'incorporation de l'uridine et de la leucine dans les A.R.N. et les protéines des cellules ascitiques de la Souris et du Rat (CLEMENT 1965). Quant à l'aminoguanidine, elle intervient dans le métabolisme des amines biogènes comme le font la plupart des substances précédentes.

La relative abondance des études précédentes contraste avec le petit nombre de documents concernant l'influence de ces mêmes substances sur les cellules embryonnaires, aspect du problème qui nous retient ici.

A cet égard, on sait que l'urée perturbe la formation du névraxe en amenant la chordalisation du tissu neural et qu'elle trouble le développement du cristallin chez l'embryon de divers Batraciens (JENKINSON, 1906, FAUTRES, 1951, DOLLANDER & MARCOMET, 1954). Par ailleurs, administré à l'embryon de Poulet de 7 à 20 heures, ce produit entraîne des déficiences neurales et somitiques (DOLLANDER, MARCOMET & AUTELIN, 1962). Donnée à des stades plus tardifs (2 à 3 jours), l'urée amène des perturbations vasculaires, des microphtalmies, de l'exencéphalie, de la coelosomie et des malformations du bec.

.../...

L'hydroxyurée, dont les propriétés cytotoxiques sont beaucoup plus marquées, possède un pouvoir tératogène, déjà signalé dans quelques travaux initiaux. Administrée dans le vitellus ovulaire, elle amène des malformations des membres et de la face de l'embryon de Poulet, ainsi que MURPHY et CHAUBE (1964) l'ont signalé sans donner de description tératologique suffisante. Lorsqu'elle est déposée sur l'aire vasculaire de l'embryon de Poulet de 3 jours, cette substance entraîne régulièrement la production d'une gueule de loup avec fissure palatine ainsi qu'une brachymélie avec coudure spécifique du tibiotarse (BODIT, STOLL et MARAUD, 1966).

Ces observations tératologiques très sporadiques montrent que certaines des substances envisagées ici et utilisées comme cytostatiques sont susceptibles de perturber le développement embryonnaire mais, du fait de leur rareté, elles n'apportent pas une contribution suffisante à la solution de ce problème, d'autant plus que les auteurs administrent ces drogues à des stades embryonnaires différents, alors que leur administration à des stades identiques est un paramètre qui doit être respecté soigneusement si l'on veut aboutir à des résultats comparables.

Notre travail vise d'abord à rechercher si les substances cytostatiques étudiées présentent une activité tératogène et à en éclairer éventuellement le mécanisme embryologique.

Il vise ensuite à élucider leur mode d'action tératologique. Dans cet ordre d'idée et à titre de première hypothèse,

.../...

nous avons d'abord essayé de voir si leur action passe par une perturbation affectant les amines biogènes dont les plus importantes, l'histamine et la sérotonine, influencent peut-être la synthèse des acides nucléiques cellulaires. Cette idée est justifiée par le fait que le phosphate de pyridoxal, coenzyme des réactions mises en jeu dans la synthèse des amines biogènes est inactivé par nos substances en particulier la semicarbazide, l'hydrazine et l'hydroxylamine qui bloquent, par cette voie vitaminique, l'activité des décarboxylases des acides aminés qui donnent normalement naissance aux amines biogènes.

Parmi ces amines, la sérotonine issue du 5 hydroxy-trytophane, est susceptible d'inhiber la division cellulaire du Crapaud et du Rat (PUKHALSKAYA, 1964). Cette même substance est également capable d'inhiber le développement de certains sarcomes de la Souris, action qui est notablement renforcée par la présence d'histamine (CRILE, 1966). La sérotonine renforce également l'action cytostatique de la sarcolysine à l'égard du sarcome M5 du Rat (REZNICHENKO, 1966).

L'histamine, diamine issue de l'histidine, a été aussi mise en cause dans la multiplication cellulaire qu'elle stimule (KAHLSON, 1962) et certains auteurs pensent que la contraction du fuseau au cours de la mitose peut être affectée par sa modification (SIMON, 1954).

De plus, toutes ces substances bloquent aussi et paradoxalement les aminoxydases, destructrices de certaines de ces amines, en particulier l'histaminase. Pour sa part, l'aminoguanidine que nous avons également étudiée, inhibe essentiellement

.../...

la destruction de l'histamine comme le fait la semicarbazide, mais sans affecter pratiquement les décarboxylases, propriété qui doit en principe permettre de choisir entre l'un ou l'autre de ces deux modes d'action, pour expliquer l'action tératogène éventuelle de ces substances.

Par ailleurs, on peut envisager une seconde hypothèse pour expliquer le mode d'action de ces produits si l'on remarque qu'ils ont en commun la possibilité d'inhiber l'action du phosphate de pyridoxal et de déclencher ainsi une carence générale en vitamine B6 qui intervient peut-être par sa seule existence dans leurs propriétés antimitotiques (TERROINE, 1967). Pour soumettre cette seconde hypothèse au contrôle des faits, nous avons également recherché si la vitamine B6, ainsi que la désoxypyridoxine qui est son antivitamine, sont susceptibles de modifier l'action des drogues étudiées.

Enfin, en troisième hypothèse, nous avons pris en considération les schémas proposés sur le mode d'action de l'hydroxyurée au cours des synthèses de l'A.D.N. Nous avons alors cherché à voir si des métabolites indispensables à ces synthèses, tels l'acide orotique et les désoxyribonucléotides, dont la production risque d'être perturbée par les produits étudiés, exerceraient une action vicariante permettant de vérifier l'exactitude de cette idée.

Dans ce domaine, un résultat positif permettrait aussi d'étendre l'explication aux autres substances étudiées et dont leur mode d'action est encore ignoré.

.../...

Les chapitres qui vont suivre montreront dans quelle mesure notre contribution expérimentale a permis de résoudre certains des problèmes posés dans cette introduction.

C H A P I T R E I

MATERIEL & METHODES

Nos expériences ont été conduites sur les embryons de la race Lod Brest Pilch's, dont les oeufs sont munis d'une petite ouverture de 7 à 8 mm. de diamètre percée dans la coquille. Elle permet de soustraire quelques centimètres cubes d'albumine destinés à faciliter l'observation de l'embryon et à l'empêcher d'adhérer au système de fermeture, manoeuvre dénuée elle-même de conséquence tératologique et qui n'empêche pas l'embryon d'aller, si c'est nécessaire, jusqu'à la fin de l'incubation, d'une durée de 21 jours environ. Cette opération est réalisée au troisième jour de l'incubation, date choisie parce qu'elle représente le moment où la manipulation est dénuée de pouvoir tératogène, ce qui ne serait pas le cas si les oeufs étaient ouverts plus tôt. Elle évite également tout risque de blesser l'embryon comme c'est le cas fréquemment si l'on ouvre les oeufs plus tard.

A l'occasion de l'ouverture, on élimine les oeufs non fécondés, les embryons qui ne sont pas au stade correct, d'après les tables de HAMBURGER et HAMILTON (1951) et ceux qui présentent des malformations spontanées repérables dès ce moment.

Cette technique permet d'administrer aisément les substances à étudier au moment opportun, soit au troisième jour lui-même à l'occasion de l'ouverture de l'oeuf, soit plus tard par simple déplacement du ruban adhésif. Elle offre également l'avantage de permettre la surveillance journalière des embryons, l'établissement d'une courbe de mortalité et l'observation des sujets malformés.

.../...

L'administration des substances peut se faire suivant deux méthodes. La première, la plus rapide, consiste à injecter à l'aide d'une seringue et à travers la coquille la substance dans le vitellus ovulaire. Sauf lorsqu'elle est appliquée, faute de mieux, tout au début de l'incubation où l'ouverture de l'oeuf n'est pas recommandée car elle est très nocive, cette méthode d'injection est défectueuse, car elle est aveugle et ne permet pas de contrôler l'état de l'embryon. De plus elle nécessite des doses élevées de substances et introduit des paramètres supplémentaires tels que la vitesse de diffusion du produit dans le vitellus et la possibilité de combinaisons chimiques modifiant la substance avant son retour à l'embryon.

La deuxième méthode, la seule que nous ayons employée, consiste à déposer le produit mis en solution à la surface de l'aire vasculaire de l'embryon grâce à la technique d'ouverture de l'oeuf telle que nous venons de la décrire.

Durant toute l'incubation, il faut veiller naturellement au maintien d'une température correcte et déplacer les oeufs tous les deux jours sur leur plateau de façon à neutraliser l'influence des quelques différences de répartition thermique qui existent toujours à l'intérieur des couveuses de type commercial.

Tous les produits que nous avons utilisés sont très facilement solubles dans l'eau distillée ou le sérum physiologique et ne nous ont donné aucune difficulté d'administration. La concentration

.../...

des diverses solutions a été calculée de telle sorte que la quantité de solvants ne dépasse pas 0,1 ml, sauf dans le cas de la sérotonine utilisée en solution commerciale et dont nous avons administré jusqu'à 0,5ml. pour les doses les plus élevées, l'action du volume restant alors négligeable.

Si l'on fait abstraction du prélèvement journalier des sujets qui meurent en cours d'expérience, nous avons sacrifié, sauf exception, tous les embryons destinés à l'étude des malformations entre le treizième et le quinzième jour d'incubation, période à laquelle celles-ci sont définitivement constituées et où il ne peut en apparaître de nouvelles.

Nous avons également prélevé des sujets dès la première partie de l'incubation entre le quatrième jour et le dixième jour dans le but d'étudier le développement des embryons anormaux. Dans ce cas, les sujets, fixés dans le liquide de Bouin Hollande, ont été inclus à la paraffine et coupés à 7 microns avant d'être colorés par les techniques usuelles telles que l'hémalun de Mayer ou l'hématoxyline associés à l'éosine et au safran.

Dans le cours du travail et pour comparer entre elles les activités toxique et tératogène des diverses substances, nous avons été amenés à déterminer leurs doses léthales (D.L.). Nous avons pris comme D.L. 50 celle qui tue la moitié des embryons entre la date de l'administration du produit et les dix

.../...

jours de l'incubation qui suivent. Cette dose léthale permet de comparer commodément l'activité tératogène des substances sur la base d'une toxicité sensiblement équivalente et dans la période au-delà de laquelle l'activité tératogène cesse de se manifester.

Le pouvoir tératologique d'une substance peut s'exprimer de deux façons différentes.

En premier lieu, on peut calculer le taux des monstres en pourcentage des embryons mis initialement en expérience. Cette formulation prête à critique car les sujets morts trop tôt pour extérioriser l'existence éventuelle d'une malformation figurent alors comme normaux dans le pourcentage. Dans ce cas, on constate paradoxalement que le pouvoir tératogène expérimenté sous cette forme, baisse avec l'augmentation de la dose du fait d'une mortalité précoce de plus en plus importante dont les victimes sont abusivement classées comme normales.

En second lieu, on peut exprimer le pouvoir tératogène en donnant le pourcentage des monstres par rapport aux sujets vivants lors du prélèvement. On évite ainsi l'écueil précédent mais on tombe dans l'inconvénient de ne pas tenir compte des sujets morts avant toute manifestation tératologique. Malgré ce défaut, nous avons adopté cette deuxième méthode qui serre le problème de plus près.

.../...

Dans le même cadre d'idée, nous avons défini pour chaque substance tératogène la malformation principale, qui est la plus fréquente et aussi les malformations secondaires qui l'accompagnent ou non et permettent le cas échéant de préciser la spécificité tératogène des substances lorsque la malformation principale est d'un type répandu.

Pour fixer les malformations principales et secondaires, nous avons fait le total des diverses anomalies, qu'elles se trouvent isolées ou associées sur un même sujet et nous avons établi leurs proportions relatives telles qu'elles figurent dans les tableaux correspondants des chapitres 2 et 3.

Parallèlement nous avons relevé, sur des embryons témoins, la fréquence des malformations spontanées pouvant être confondues à celles que déclanchent les substances étudiées.

Dans le chapitre 2 qui va suivre, nous envisagerons successivement les résultats obtenus avec l'hydroxyurée, la semicarbazide, l'hydrazine, l'hydroxylamine et l'aminoguanidine pour voir si elles possèdent des pouvoirs tératogènes comparables puisque leur structure chimique et certaines de leurs propriétés cytologiques sont voisines.

Dans le chapitre 3, nous rapporterons ce que nous avons obtenu en administrant soit des amines biogènes, soit la vitamine B6 et son antivitamine, soit des métabolites de l'A.D.N., tels que l'acide orotique et les désoxyribonucléotides, toutes ces substances étant susceptibles d'être impliquées dans l'action tératogène des produits utilisés.

C H A P I T R E II

SUR L'ACTION TERATOGENE DE L'HYDROXYUREE

DE LA SEMICARBAZIDE ET DE SUBSTANCES APPARENTEES

I - MALFORMATIONS SPONTANEES

II - ACTION DE L'HYDROXYURE

A - Pouvoir toxique

B - Pouvoir tératogène :

a) Malformations obtenues

b) Leur formation

1 - Evolution normale de la face et des membres

2 - Evolution de la face et des membres chez les embryons anormaux

III - ACTION DE LA SEMICARBAZIDE

A - Pouvoir toxique

B - Pouvoir tératogène :

a) Malformations obtenues,

b) Evolution de la tête et des membres chez les embryons anormaux.

IV - ACTION DE LA THIOSEMICARBAZIDE

A - Pouvoir toxique

B - Pouvoir tératogène

V - ACTION DE L'HYDRAZIDE

A - Pouvoir toxique

B - Pouvoir tératogène

VI - ACTION DE L'HYDROXYLAMINE

A - Pouvoir toxique

B - Pouvoir tératogène

VII - ACTION DE L'AMINOGUANIDINE

A - Pouvoir toxique

B - Pouvoir tératogène

VIII - ACTION COMPAREE DES DIVERSES SUBSTANCES

Ainsi qu'il ressort du plan et après une courte étude des malformations spontanées pouvant être confondues avec celles que donnent les substances étudiées, nous examinerons ici l'action tératogène de l'hydroxyurée, de la semicarbazide, de la thiosemicarbazide, de l'hydrazine, de l'hydroxylamine et de l'amino-guanidine.

Nous décrirons les malformations obtenues, leur mode de formation, les problèmes qu'ils soulèvent et nous rechercherons si la parenté de structure chimique de ces substances entraîne une communauté d'action tératologique.

I - MALFORMATIONS SPONTANEES -

Les divers produits examinés ici donnent essentiellement des malformations du bec et des pattes qui peuvent également se voir spontanément dans un petit pourcentage de cas. Cette donnée est utile à connaître pour déterminer si les malformations observées sont fortuites ou produites par une action tératogène propre des substances, étant entendu qu'à l'ouverture des oeufs au troisième jour de l'incubation, les embryons déficients sont éliminés, qu'ils soient destinés à fournir des témoins ou à être traités. La présente statistique ne concerne donc que les malformations spontanées survenant chez les témoins entre le troisième et le quatorzième jour de l'incubation, période où l'activité tératogène des substances est précisément étudiée.

.../...

Sur 160 embryons témoins vivants au 14ème jour, nous avons enregistré 5% de malformations en rapport avec nos recherches et comprenant 2 micrognathies, 10 coudures du tibiotarse ou du tarsométatarse, 3 brachymélies et 2 ankyloses, certaines de ces malformations pouvant coexister chez un même sujet.

II - ACTION DE L'HYDROXYUREE -

A - Pouvoir toxique

L'hydroxyurée est un antimitotique relativement peu toxique pour l'embryon de poulet, du moins si l'on compare son activité à celle que présentent les autres antimitotiques appartenant en particulier au groupe des radiomimétiques. En effet, lorsque la substance est injectée à trois jours, la dose léthale 50 (D.L. 50), telle que nous l'avons définie, se situe aux alentours de 0,250 mg, tandis que la D.L. 100 est légèrement supérieure à 1 mg. La mortalité embryonnaire est maxima deux jours après l'administration du produit et, par la suite, elle se maintient assez régulièrement mais à un niveau plus faible. Ces deux doses léthales augmentent lorsque la substance est donnée plus tard du fait que les embryons, en se développant, les supportent de mieux en mieux.

B - Pouvoir tératogène

Chez l'embryon traité à trois jours, le pouvoir tératogène apparaît pour des doses comprises entre 0,100 et 0,250 mg.

.../...

T A B L E A U II

ACTION TERATOGENE DE L'HYDROXYUREE

Age d'admn.	Dose en mg.	Nombre d'embryons	Mortalité	Nbre de survivants	Nbre de malformés	% de malformés s/ les survivants
3 j.	0,250	41	56%	18	5	27%
	0,500	82	78%	18	11	61%
	0,750	69	85%	10	9	86%
	1	111	93%	8	8	100%
5 j.	0,250	31	48%	16	1	6%
7 j.	0,250	57	31%	39	2	5%
	0,500	58	24%	44	4	9%
9 j.	0,500	22	54%	10	0	0
11 j.	0,500	45	44%	25	1	4%
13 j.	0,500	18	44%	10	0	0

.../...

Il se révèle important d'entrée puisqu'on obtient 27% environ de sujets anormaux. En augmentant la dose jusqu'à 1 mg, on note que tous les sujets sacrifiés entre 13 et 15 jours sont monstrueux et on retrouve toutes les gradations entre ces deux termes extrêmes du pouvoir tératogène. L'administration plus tardive de l'hydroxyurée entraîne la diminution du pourcentage des sujets malformés qui devient nul chez les embryons traités après 7 jours.

a) Malformations obtenues

Les anomalies que l'embryon manifeste varient en fonction de l'âge auquel l'hydroxyurée est administrée.

Lorsqu'il est traité à trois jours, la malformation principale intéresse les membres inférieurs où elle est représentée par une brachymélie bilatérale qui frappe 32% des sujets. Dans la moitié des cas elle est accompagnée d'une coudure des tibiotarses, à concavité postérieure localisée au tiers inférieur de la pièce, coudure qui peut se voir également sur le tarsométatarse des membres inférieurs mais plus rarement (Fig.1).

Enfin, dans 4% des cas, l'articulation de ce membre située entre le tibiotarse et le tarsométatarse est ankylosée, interdisant la mobilisation de ces deux segments l'un par rapport à l'autre.

.../...

Parmi les malformations secondaires, le bec de lièvre, preque toujours bilatéral, frappe 24% des sujets et se situe au premier rang. Cette monstruosité se caractérise par une déficience bilatérale des parties latéropostérieures du bec supérieur tandis que la partie médiane et antérieure du bec comprenant le prémaxillaire reste sensiblement normale. Il se crée ainsi deux brèches faciales latérales, faisant disparaître toute la partie inférieure des narines et par lesquelles on aperçoit les cavités nasales et en particulier les cornets inférieurs. Le bec de lièvre peut être assorti ou remplacé parfois par d'autres anomalies secondaires se caractérisant par une micrognathie quelquefois asymétrique (10%), qui se traduit par une réduction des mandibules. Enfin, dans 16% des cas, on note également l'atrophie de la paupière supérieure qui ne recouvre plus la portion correspondante de l'oeil.

Lorsque l'hydroxyurée est administrée à 5 jours, le bec de lièvre disparaît mais on peut encore obtenir des asymétries du bec. Enfin, les anomalies des membres ne s'observent plus, du moins à un taux supérieur aux anomalies spontanées, lorsque l'hydroxyurée est donnée après 7 jours.

b) - Leur formation

Les malformations que nous avons observées, tant avec l'hydroxyurée qu'avec la semicarbazide, intéressent la face d'une part et les membres inférieurs d'autre part. Avant d'aborder le

.../...

Fig. 1 - Embryon 16 jours traité par l'hydroxyurée à 5 jours.

On remarque et l'importante coudure de la patte localisée sur le tibiotarse et l'asymétrie du bec.

développement des sujets anormaux, nous allons d'abord décrire l'évolution normale, en nous fondant sur des documents classiques (DUVAL, 1889 ; HAMBURGER et HAMILTON, 1951 ; ROMANOFF, 1960 ; ALTMAN et DITTMER, 1964).

1 - Evolution normale de la face et des membres chez l'embryon de poulet -

Chez les Oiseaux, comme chez les Mammifères, la formation du massif facial est tributaire de l'évolution du bourgeon frontal et du premier arc branchial.

A partir de la 50ème heure d'incubation, correspondant dans les conditions de nos expériences à l'embryon de poulet de 22 somites environ, on voit apparaître l'appareil branchial sur les parois latérales de l'intestin céphalique. Il est formé de dépressions ou poches étendues dans le sens dorso-ventral et qui sont initialement au nombre de deux pour atteindre finalement le chiffre de quatre sur une vue extérieure. Lorsque cet appareil est à son maximum de développement, au quatrième jour de l'incubation, les poches interceptent entre elles des arcs branchiaux en saillie et qui sont également au nombre de quatre en vue extérieure et de cinq en vue intérieure.

A ce moment, en regardant de face l'extrémité céphalique d'un embryon de 4 jours, on aperçoit les principaux éléments qui donneront naissance au massif facial et qui sont en place autour d'une dépression médiane représentant la bouche primitive ou stomodaeum. Celle-ci est délimitée à sa partie

.../...

T A B L E A U III

FREQUENCE RELATIVE DES DIVERSES MALFORMATIONS CHEZ L'EMBRYON TRAITE A 3 JOURS, LE MEME SUJET ETANT GENERALEMENT PORTEUR DE PLUSIEURS ANOMALIES

	HYDROXYUREE		SEMICARBAZIDE	
	Répartition des malformations en %			
Tête				
Bec de lièvre	24%		0	
Bec inférieur :				
micrognatie courante	10%	34%	0	29,1%
micrognatie avec angulation par anomalie du dentaire	0		29,1%	
Paupière supérieure atrophique ..	16%	16%	16,1%	16,1%
Membres inférieurs				
Brachymélie	32%		16,1%	
Coudure	14%	50%	25,8%	54,8%
Luxation tibia-tarsométatarse ..	0		12,9%	
Ankylose articulaire	4%		0	

.../...

supérieure par le bourgeon frontal qui la surplombe. Ce bourgeon est parcouru, à sa face inférieure, par deux dépressions antéropostérieures appelées fossettes olfactives, qui le scindent en bourgeons nasaux externes, situés du côté des deux yeux, et en bourgeons nasaux internes placés de part et d'autre de la région mediane du bourgeon frontal.

La partie inférieure du stomadaeum est formée par l'arc mandibulaire constitué par la réunion sur la ligne médiane des deux éléments droit et gauche du premier arc qui, entre 2 et 4 jours, sont allés à la rencontre l'un de l'autre pour fusionner. Cet arc constitue l'ébauche du bec inférieur des Oiseaux et fournit également la mâchoire inférieure des Mammifères.

Les parois latérales de la bouche primitive sont formées à droite et à gauche par les bourgeons maxillaires supérieurs, diverticules issus du premier arc et qui sont séparés du bourgeon nasal externe par la fente oculo-stomodéale s'étendant de la bouche primitive jusqu'à la cupule optique. Cette fente disparaît ensuite lorsque les bourgeons maxillaire supérieur et nasal externe fusionnent, vers 5 jours, en isolant l'orbite. Par la suite, ces mêmes bourgeons maxillaires progressent vers la ligne médiane pour fusionner avec les deux bourgeons

.../...

nasaux internes et constituer ainsi le massif médian du bec supérieur bien individualisé à 7 jours (Fig.2).

Au cours de ces mouvements morphogénétiques, les fossettes olfactives sont formées vers le bas et les orifices narinaires constitués. La cavité stomodéale circonscrite par la formation du massif facial est ensuite divisée en cavité nasale et buccale par les processus palatins qui apparaissent entre 4 et 5 jours et terminent leur mouvement vers 10 jours à 11 jours. Ceux-ci se détachent de la face interne des bourgeons maxillaires supérieurs et également des processus jugaux qui sont plus postérieurs. Chez les Mammifères, ces éléments fusionnent pour former une cloison horizontale continue séparant le nez de la bouche, alors que chez l'embryon de poulet, ils n'arrivent pas au contact l'un de l'autre et laissent persister une fente bien visible. Enfin, la cloison sagittale des fosses nasales qui sépare les deux narines se forme à partir de la région médiane du bourgeon frontal. A partir de 6 jours, le bec inférieur commence à se dessiner et à s'allonger spécialement sur la ligne médiane, tandis que le bec supérieur a une croissance plus rapide. Entre 6 et 9 jours, les premiers mouvements du bec apparaissent.

Les bourgeons faciaux, d'origine branchiale, et qui donneront le bec, sont constitués par une zone centrale mésenchymateuse recouverte d'ectoderme qui se trouve en certains points en continuité avec l'entoderme, tandis que le bourgeon frontal comprend en plus toute la partie antérieure des vésicules cérébrales.

.../...

Les pièces squelettiques du bec qui sont affectées par les malformations étudiées ici se forment à partir d'une condensation initiale du tissu mésenchymateux qui s'ossifie ensuite suivant les processus de membrane où il n'est pratiquement pas fait appel aux pièces cartilagineuses primitives, telles que le cartilage de Meckel formé dans l'arc mandibulaire. Les dates de première ossification de ces pièces squelettiques varient quelque peu suivant les auteurs. En se référant au tableau de SCHINZ et ZAGERL (1937) et à celui de ERDMANN (1940), les premiers signes d'ossification apparaissent à partir de 6 jours, et on peut situer au neuvième jour l'apparition des premiers points d'ossification intéressant le prémaxillaire constituant le squelette du bec supérieur. Pour le bec inférieur, le supraangulaire commence à s'ossifier vers 8 jours. A 12 jours, l'ossification des maxillaires est très avancée.

Quant au membre inférieur, également touché par des malformations, son apparition se manifeste chez l'embryon de 29 à 32 somites (52 à 64 heures d'incubation), sous la forme d'une crête localisée au niveau des parties latérales de l'embryon, comme celle du membre supérieur. A partir de 4 jours, cette crête se renfle à son extrémité distale pour constituer la palette, origine des doigts de la patte, et qui reste insérée sur les parois du corps par une partie cylindrique rétrécie qui donnera naissance aux deux segments proximaux de la patte. Entre 5 et 6 jours et demi, la séparation devient nette entre les trois segments du membre inférieur et durant la même période, on voit apparaître dans l'axe du membre des condensations

.../...

mésenchymateuses qui donnent presqu'aussitôt le squelette cartilagineux de la patte. C'est à la même période que l'ébauche du tarse se divise en ses deux composants, l'un, proximal, se rattachant au tibia, l'autre, distal, se raccordant aux métatarsiens. Au neuvième jour, le cartilage proximal du tarse, qui est prêt à se souder au tibia, représente sensiblement le tiers de la longueur du futur tibiotarse, lequel est constitué au dixième jour, la fusion de ces deux constituants une fois faite (SCHMALHAUSEN, 1926). Vers le même moment, apparaissent les premiers signes d'ossification périostique, associés à la formation de la cavité médullaire diaphysaire aux deux extrémités de laquelle se trouvent les zones d'ossification enchondrale, processus très avancés dès les débuts de la deuxième partie de l'incubation, tandis que les épiphyses ne s'ossifient qu'après l'éclosion.

2 - Evolution de la face et des membres chez les embryons anormaux, traités par l'hydroxyurée

Le bec de lièvre engendré par cet antimitotique se produit suivant les processus classiques qui lui donnent naissance, quel que soit l'agent tératogène.

La fusion des bourgeons maxillaires supérieurs avec les bourgeons nasaux externes, qui est l'un des premiers processus de la formation de la face, se réalise vers 5 jours comme dans les conditions normales, probablement parce que l'antimitotique arrive trop tard pour perturber ce mécanisme. De ce fait, la fente oculo-stomodéale disparait, fermant la partie antérieure de l'orbite.

.../...

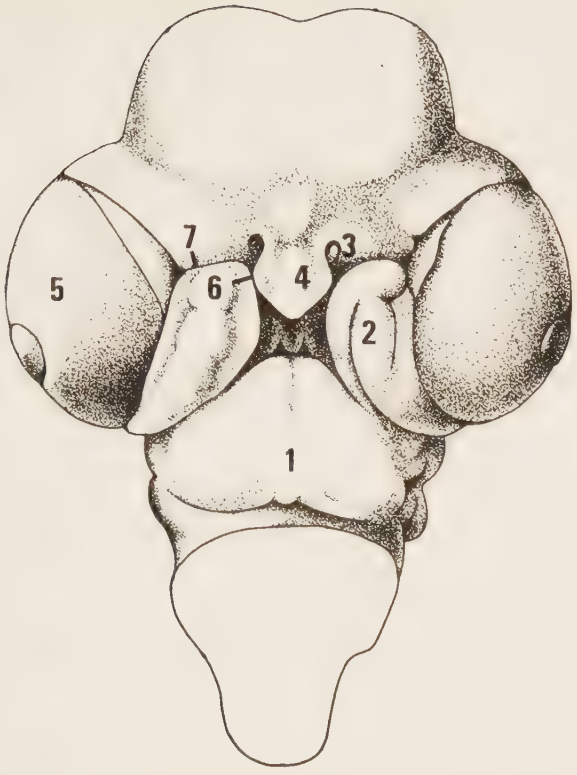


Fig. 2 - Embryon normal de 6 jours. Formation de la face.
maxillaire inférieur (1)
bourgeons maxillaires supérieurs (2) nasaux externes (3)
nasaux internes (4) oeil (5)
(6) Zone de fusion entre (2) et (4)
(7) Zone de fusion entre (2) et (3) qui entraine la fermeture de la fente oculo-stomodéale.
Le bec de lièvre résulte d'une absence de fusion entre (2) et (4)

Par contre, la croissance des bourgeons maxillaires supérieurs qui entraîne leur fusion avec les bourgeons nasaux internes, normalement réalisée à 6 jours, fait défaut chez certains individus traités par l'hydroxyurée alors que le prémaxillaire du bec supérieur qui dérive des bourgeons nasaux internes se présente sous un aspect sensiblement normal. Du fait de cette inhibition, le bord inférieur des narines ne se constitue pas et tout ce segment du maxillaire supérieur fait défaut. Il ouvre ainsi largement à l'extérieur la cavité des fosses nasales livrant l'image qu'on observe chez des sujets où la malformation est constituée. Cette large ouverture est encore accentuée par le fait que les processus palatins normalement issus des bourgeons maxillaires supérieurs manquent dans la région où ces bourgeons eux-mêmes ne se sont pas développés. Lorsque l'hydroxyurée est donnée à une période où les phénomènes morphogénétiques essentiels du bec sont déjà réalisés, comme c'est le cas à 5 jours, on voit disparaître le bec de lièvre.

Dans le cas où la malformation faciale se traduit simplement par une asymétrie du bec, l'aspect même de l'anomalie permet d'en reconstituer le mécanisme et de voir dans quel sens a porté l'inhibition de la croissance faciale.

Au niveau de la patte, la manifestation tératogène de l'hydroxyurée est plus tardive qu'au niveau du bec puisque la coudure à convexité antérieure que présente le tibiotarse apparaît vers 9 jours, alors que le produit est administré à 3 jours. L'apparition tardive de cette malformation explique qu'on puisse encore l'obtenir en donnant ce produit à 7 jours, date où il n'est plus

.../...

capable de donner naissance au bec de lièvre. Ce fait explique que l'administration tardive de l'antimitotique modifie la répartition des malformations ainsi que nous l'avons noté précédemment.

L'apparition de l'anomalie de la patte vers le dixième jour coïncide avec la mise en train des processus d'ossification périostique qui sont inhibés suivant un mécanisme que nous décrirons en détail à propos de la semicarbazide où ils se manifestent avec le plus de netteté. La pièce squelettique devient alors moins résistante et permet la coudure qui se situe approximativement à la jonction du 1/3 inférieur avec les 2/3 supérieurs du tibiotarse, à l'endroit où le cône cartilagineux formé essentiellement par le segment tarsal du tibiotarse, se raccorde au tibia en s'insérant dans l'étui périostique dont il clôt la cavité médullaire en cours de réalisation. Ce cône en partie luxé hors du manchon périostique déficient est attiré vers la partie dorsale, faisant souvent une angulation aiguë avec le reste du tibiotarse.

Dans certains cas, où les embryons restent extérieurement normaux, la transparification des sujets selon la méthode de Lundvall, montre néanmoins l'existence d'une légère courbure transitoire et localisée au milieu du tibiotarse, région qui aurait dû précisément disparaître pour donner naissance à la cavité médullaire.

Etant donné que la pièce squelettique ne présente apparemment pas d'inégalité de croissance expliquant ces angulations, on est amené à penser qu'elles sont imputables à la

.../...

tonicité prédominante des muscles nombreux et puissants de la face postérieure de la jambe, que nous décrirons d'après MARSHALL (1; 60) et qui tendent à courber le tibiotarse vers l'arrière. Ce dernier s'incurve au point de moindre résistance qui est dû en particulier aux troubles dans les processus d'ossification formant la gaine d'os périostique qui assure normalement la cohésion et la solidité de toute la pièce squelettique.

Parmi les muscles prépondérants, figure le gastrocnémien qui naît tant de la face inférieure du fémur que de la face supérieure du tibiotarse pour se terminer par le tendon d'Achille, qui se fixe postérieurement sur l'hypotarse et le tarsométatarse, insertions qui font exercer à ce muscle une traction allant dans le sens d'une courbure du tibiotarse vers l'arrière. Les muscles fléchisseurs des doigts, représentant la couche postérieure profonde, s'insèrent aussi tant sur la face inféropostérieure du fémur que sur la face supéropostérieure du tibiotarse et les tendons qui les prolongent passent à la partie postérieure de la patte pour se distribuer aux doigts. Les tractions exercées par ce groupe musculaire agissent dans le même sens que le gastrocnémien.

Les muscles antagonistes susceptibles d'agir en sens inverse par leur tonicité, sont moins puissants et comprennent le tibial antérieur s'étendant du fémur et du tibiotarse d'une part à la face antérieure du tarsométatarse d'autre part. L'extenseur commun des doigts qui fait également partie de ce groupe se détache lui aussi de la face antérieure du tibiotarse pour se rendre aux doigts. Par contre, il ne semble pas que l'on puisse

.../...

attribuer un rôle au muscle long péronié du fait de ses insertions et de son trajet latéral.

Par la suite, une fois l'angulation réalisée, celle-ci fait l'objet de phénomènes d'ossification aberrants qui affectent la concavité de l'os, tandis que la partie antérieure de la coudure prend l'aspect d'une véritable épine osseuse très saillante, chez les embryons arrivés en fin d'incubation.

Lors de l'apparition de la malformation, la patte paraît plus courte que normalement mais la brachymélie n'est généralement qu'apparente, car elle résulte simplement de la coudure du membre. Par la suite, les perturbations ainsi apportées au développement de la patte entraînent fréquemment une véritable brachymélie et une ankylose de l'articulation entre le tibiotarse et le tarsométatarse, les doigts de la patte étant en flexion très prononcée.

La coudure antérieure qui s'observe, mais rarement, sur le tarsométatarse, nous paraît explicable par un mécanisme analogue à celui qui crée la coudure du tibiotarse.

III - ACTION DE LA SEMICARBAZIDE

A - Pouvoir toxique

La semicarbazide est moins toxique que l'hydroxyurée. Ainsi, chez les embryons traités à 3 jours, la D.L. 50 est de

.../...

l'ordre de 0,500 mg. alors que la D.L. 100 dépasse de peu 2,5 mg.

La mortalité précoce frappe les embryons dès le lendemain de l'application du produit et se maintient pendant trois jours environ pour décroître ensuite nettement. Plus on en retarde l'administration, mieux les embryons le supportent et plus les doses léthales augmentent par voie de conséquence.

B - Pouvoir tératogène

La semicarbazide paraît moins tératogène que l'hydroxyurée lorsqu'on l'administre à 3 jours puisqu'à égalité de D.L.50, on trouve 18% de sujets malformés contre 27% avec l'hydroxyurée.

A égalité de dose, mais en appliquant le produit plus tardivement, on observe une augmentation progressive et importante du taux des malformations jusqu'à 9 jours, période à laquelle cette substance se révèle beaucoup plus tératogène que l'hydroxyurée. Passé 9 jours au contraire, le pourcentage des malformations diminue jusqu'à devenir nul, après 11 jours.

a) Malformations obtenues

Chez les embryons traités à trois jours, la malformation principale affecte le membre inférieur comme c'était déjà le cas pour l'hydroxyurée, mais l'aspect et la répartition des anomalies qui s'y voient est différente.

La coudure bilatérale avec éperon antérieur marqué affectant le tiers inférieur du tibiotarse devient ici la malformation

.../...

T A B L E A U IV

ACTION TERATOGENE DE LA SEMICARBAZIDE (S.C.)

& DE LA THIOSEMICARBAZIDE (T.S.C.)

Age d'admn.	Dose en mg.	Nombre d'embryons	Mortalité	Nbre de survivants	Nbre de malformés	% de malformés s/ les survivants
	S.C.					
3 j.	0,500	54	49%	28	5	18%
	0,750	27	59%	11	8	72%
	1	82	59%	34	28	84%
	2,5	15	80%	3	3	100%
7 j.	0,125	43	18%	35	7	20%
9 j.	0,125	88	10%	79	29	36%
10 j.	0,125	39	0%	39	9	23%
11 j.	0,125	34	5%	32	2	6%
	T.S.C.					
3 j.	0,500	55	78%	12	6	50%
	0,750	61	80%	12	4	33%
	1	26	65%	9	6	66%

.../...

principale puisqu'elle affecte 26% environ des sujets. Dans 16% des cas, elle est accompagnée d'une brachymélie indépendante du raccourcissement du membre lié à la coudure et enfin à un degré un peu moindre (13%) d'une anomalie spécifique jamais signalée jusqu'ici à notre connaissance. Celle-ci se caractérise par une déficience du tégument externe et des éléments articulaires couvrant la partie dorsale de l'articulation comprise entre le tibiotarse et le tarsométatarse. Cette carence est si prononcée dans certains cas que l'épiphyse tibiale mise à nu se luxe en direction postéro-inférieure et que l'on peut croire au premier abord à un artéfact

Parmi les malformations secondaires, celles du bec viennent en tête. Elles sont représentées par une coudure de la mandibule inférieure telle que celle-ci, au lieu d'être sensiblement rectiligne, présente une angulation avoisinant 90°, orientée vers le bas, dûe à une saillie intéressant la région du tiers postérieur du maxillaire inférieur. Par contre, le bec de lièvre qui est une anomalie fréquente avec l'hydroxyurée n'apparaît pas. (Fig.3).

Enfin, l'atrophie de la paupière supérieure qui découvre la partie correspondante du globe oculaire se retrouve dans les proportions identiques à celles qui se manifestent dans le cas de l'hydroxyurée.

Chez les embryons traités au delà de trois jours, le taux des sujets malformés par rapport aux survivants augmente, tandis que la mortalité tend à diminuer comme en témoigne la

.../...

Fig. 3 - Embryon 17 jours traité par la semicarbazide.
On note l'angulation du bec inférieur.

D.L. 50, ce qui permet d'obtenir un pourcentage élevé de malformations avec des doses beaucoup plus faibles. On assiste simultanément à une modification dans les proportions des diverses anomalies, manifeste chez les sujets traités à 9 jours. Les malformations de la patte restent les plus fréquentes et la coudure du tibiotarse, devient prédominante. Elle présente des variations du sens de l'angulation qui peut aller à l'inverse de la situation habituelle, exceptions qui paraissent dûes à des troubles sporadiques d'ossification asymétrique favorisant l'action de groupes musculaires n'intervenant habituellement pas dans la coudure de type classique. Alors que les malformations secondaires comme la brachymélie tendent à disparaître, on observe encore la luxation entre le tibiotarse et le tarsométatarse.

Au niveau du bec, l'angulation est remplacée par des asymétries de développement intéressant la mandibule supérieure ou inférieure et qui donnent naissance à des sujets porteurs d'un bec croisé (3 %).

Passé 11 jours, l'administration de la semicarbazide n'entraîne plus de conséquences tératogènes du fait de la maturation progressive de l'organisme dont les organes bien différenciés deviennent alors incapables de répondre par une modification anatomique tant soit peu importante à l'action antimitotique du produit.

b) Evolution de la tête et des membres chez les embryons anormaux, traités par la semicarbazide.

Comme nous l'avons noté à propos de l'hydroxyurée, il

.../...

très difficile de saisir sur le vif et par conséquent de décrire les diverses inégalités de croissance qui aboutissent soit à l'asymétrie du bec, soit à l'atrophie de la paupière supérieure, car elles surviennent tard et intéressent un organe dont les grandes lignes de la morphogénèse n'ont pas été perturbées. Dans ce cas, le simple vu de l'anomalie permet de reconstituer aisément le sens dans lequel l'inhibition de croissance s'est effectuée.

Quant à l'angulation du maxillaire inférieur, anomalie caractéristique, elle rappelle l'aspect extérieur que présente cet organe dans les stades initiaux de l'évolution de la face et ce rapprochement donne à penser, au premier abord, que la semicarbazide maintient une morphologie du maxillaire propre à un stade embryonnaire et qui serait passager dans les conditions normales. Il n'en est rien, car ce type d'anomalie apparaît également chez des embryons traités à 10 jours, période où le bec présente son aspect classique. Cette constatation montre que l'angulation du bec inférieur résulte de troubles apparaissant passé 10 jours. Ils intéressent le tiers postérieur des branches droite et gauche du maxillaire, et sont en rapport avec un trouble de l'ossification comme nous le verrons plus loin.

Les anomalies de la patte, identiques à celles que déclenche l'hydroxyurée, se forment tardivement dans l'incubation puisqu'on les obtient en traitant des embryons relativement âgés avec des doses faibles. Le meilleur résultat s'observe après administration du produit à 9 ou 10 jours, période

.../...

où les processus d'ossification périostique s'installent, et dont la perturbation est à l'origine des malformations de la patte. La limite ultime d'action du produit se situe peu après 11 jours, date à laquelle l'ossification est trop avancée pour que le produit puisse agir. L'apparition tardive de la malformation permet d'exclure l'éventualité de troubles précoces affectant la formation initiale de l'ébauche cartilagineuse du membre puisque celle-ci est déjà constituée à ce moment, interprétation à laquelle on aurait pu penser.

Dans le cas de l'administration de semicarbazide à 10 jours, stade où les phénomènes sont les plus faciles à lire, les premiers signes de modification affectant le tibiotarse se voient dès 11 jours à un moment où la coudure ne s'est pas encore manifestée. Ils se traduisent par un retard de l'érosion cartilagineuse qui entraîne un moindre volume de la cavité médullaire diaphysaire. On note également un retard dans l'élaboration de la gaine diaphysaire d'os périostique, élément fondamental de la solidité de la pièce squelettique, et qui s'objective par une moindre épaisseur et une moindre longueur des lamelles d'os créées. La coudure apparaît à 12 jours et se localise à l'endroit où l'os est le plus mince et où le cône cartilagineux qui constitue l'épiphyse distale du tibiotarse se poursuit par la cavité médullaire. Sous l'influence des muscles prédominants, le cône cartilagineux se désinsère alors du manchon osseux périostique, anormalement fragile, et bascule généralement vers l'arrière, processus terminé à 13 jours (Fig. 4 & 5).

La déficience osseuse qui se produit sous l'influence de la semicarbazide n'est pas seulement quantitative, mais elle

.../...

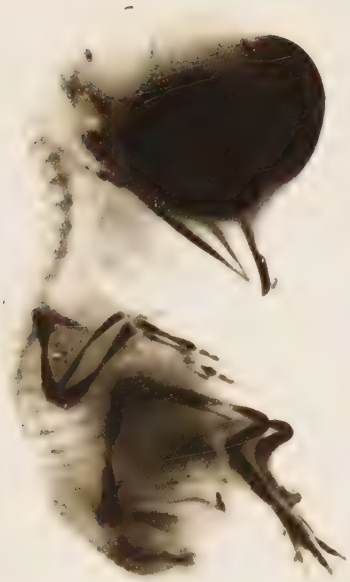


Fig. 4 - Embryon 13 jours traité par la semicarbazide et transparifié suivant Lundval.

On aperçoit nettement la coudure affectant les tibiotarses.

est également qualitative. En effet, si l'on compare les préparations colorées par les techniques usuelles avec celles qui sont traitées par la méthode de Kossa pour objectiver les dépôts calciques, on constate un moindre dépôt du calcium qui affecte alors la qualité de l'os au niveau de la coudure, alors que ces différences qualitatives tendent à disparaître en allant vers les épiphyses.

A partir de cette date, des formations aberrantes d'os périostique comblent progressivement la plus grande partie de la concavité comprise entre les deux segments du tibiotarse atteint par l'incurvation. Les lamelles constitutives de cet os, pas toujours entièrement calcifiées à 13 jours, ne présentent pas l'orientation circulaire caractéristique de l'os périostique normal, mais sont perpendiculaires au grand axe du tibiotarse. L'anomalie osseuse est alors fixée définitivement. Les incurvations du membre, quelque peu différentes de la coudure typique que nous venons de décrire, se font suivant le même processus général imputable à une déficience de l'ossification. Les angulations que l'on peut observer au niveau du tarsométatarse s'expliquent par un mécanisme similaire comme on peut le vérifier par l'observation de l'embryon transparifié, selon la méthode de Lundvall.

Par ailleurs, certains sujets présentent des suffusions hémorragiques en nappes à la suite de ruptures vasculaires intéressant les petits vaisseaux qui passent dans le tissu conjonctif sous-cutané à la partie postérieure de l'articulation entre tibiotarse et tarsométatarse. Cet état de choses entraîne des lésions

.../...

Fig. 5 - En haut, tibiotarse d'embryons de 12 jours normal (N_0) ou traité par la semicarbazide (Sc).

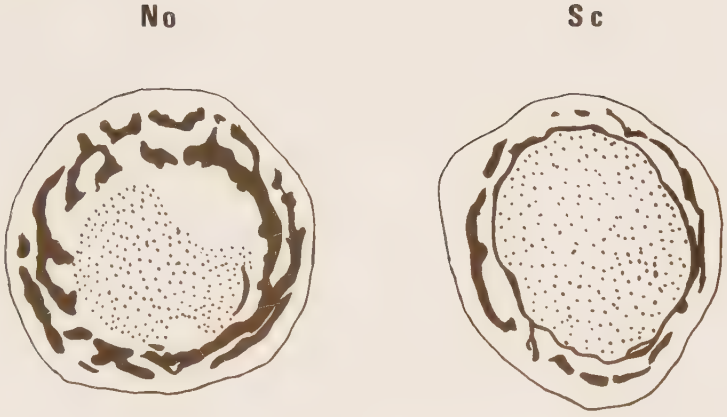
Le dessin réalisé à la chambre claire après coloration des travées d'os périostique suivant Kossa montre une déficience osseuse manifeste chez le sujet traité et ce, avant l'apparition de la coudure.

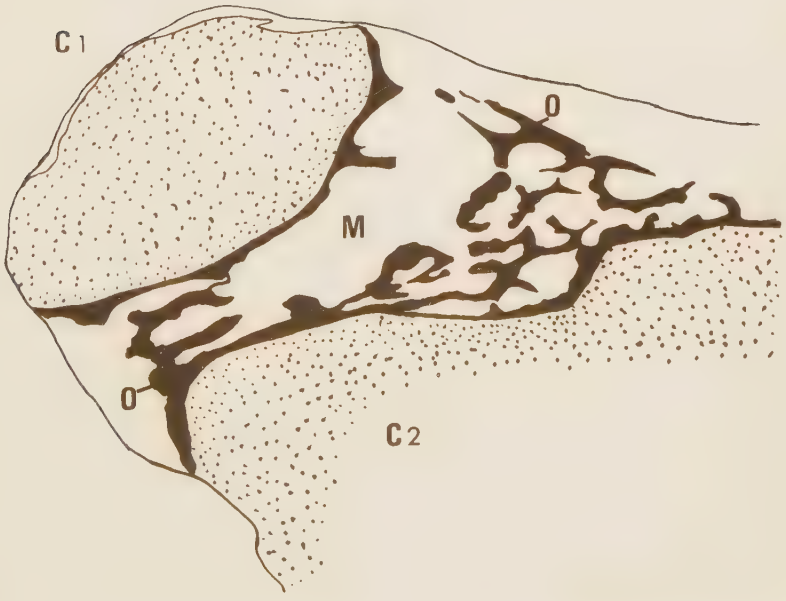
En bas, coupe transversale de la coudure du tibiotarse d'un embryo de 12 jours traité.

C1 segment inféroeur cartilagineux

C2 segment supérieur cartilagineux

On note la déficience osseuse sur les parties périphériques de la pièce squelettique alors que des travées osseuses aberrantes se sont développées dans la concavité de la coudure.


No
Sc


C1
O
M
O
C2

affectant les tissus conjonctifs et le tégument externe entourant la partie postérieure de l'articulation. Dans ces conditions, on comprend que l'épiphyse inférieure du tibiotarse soit mise à nue et fasse alors saillie à la partie postérieure de l'articulation, anomalie très particulière que nous avons signalée antérieurement, qui se voit dans 13% des cas environ et qui n'est pas nécessairement associée à la coudure du tibiotarse.

En ce qui concerne l'angulation qui frappe le maxillaire inférieur, la transparification révèle également une moindre densité osseuse du maxillaire, mais dans ce cas précis, la mise en cause des muscles masticateurs n'explique pas la coudure d'une façon satisfaisante.

IV - ACTION DE LA THIOSEMICARBAZIDE -

A - Pouvoir toxique

La toxicité de ce dérivé soufré se situe sensiblement entre celle de l'hydroxyurée et de la semicarbazide.

B - Pouvoir tératogène

Ce pouvoir est voisin de celui de la semicarbazide tant au point de vue des types de malformations que de leur pourcentage relatif.

Néanmoins, l'introduction du soufre dans la molécule amène une atténuation de l'importance anatomique des anomalies

.../...

dont l'évolution tératogène est la même que dans le cadre de la semicarbazide.

V - ACTION DE L'HYDRAZINE

A - Pouvoir toxique

L'hydrazine, qui inhibe tant les décarboxylases que les aminoxydases est un peu plus toxique pour l'embryon de poulet que l'hydroxyurée ou la semicarbazide lorsqu'elle est administrée à 3 jours. La mort des embryons survient généralement 24 heures après l'administration du produit, la D.L. 50 se situant vers 0,060 mg, tandis que la D.L. 100 est de l'ordre de 0,250 mg. A égalité de dose, le pouvoir toxique tend à diminuer au fur et à mesure que l'on donne l'hydrazine plus tardivement dans l'incubation.

B - Pouvoir tératogène

Au premier abord, le pouvoir tératogène de ce corps paraît faible lorsqu'il est appliqué à 3 jours, puisque nous n'avons relevé que 8 embryons malformés sur 94 sujets survivants au quatorzième jour. Parmi ces sujets, 2 présentaient une coudure bilatérale du tibiotarse et du tarsométatarse, déjà rencontrée avec l'hydroxyurée et la semicarbazide ; 3 etaient atteints d'une ankylose de l'articulation entre tibiotarse et tarsométatarse associée dans un cas à la brachymélie et les deux derniers montraient une brachymélie avec angulation du tarsométatarse et une micrognathie inférieure.

.../...

T A B L E A U V

ACTION TERATOGENE DE L'HYDRAZINE

Age d'admn.	Dose en mg.	Nombre d'embryons	Mortalité	Nbre de survivants	Nbre de malformés	% de malformés s/ les survivants
3 j.	0,060	75	48%	39	3	7,6%
	0,125	142	61%	55	5	9%
	0,250	45	100%	0	0	-
9 j.	0,100	55	23%	42	25	59%
10 j.	0,100	19	0	19	2	10,5%
	0,200	138	12%	121	13	10%

.. /...

Le maximum d'action tératogène de l'hydrazine se rencontre chez les embryons traités à 9 jours. Dans ces conditions le quart des sujets survivants présente la malformation caractéristique se traduisant par la coudure typique bilatérale du tibiotarse associée, dans un moindre pourcentage, à des coudures du tarsométatarse.

Lorsqu'on administre l'hydrazine plus tardivement, à 10 jours, les anomalies tendent à disparaître. Elles sont plus discrètes et leur localisation varie puisqu'elle intéresse alors la zone médiane du tibiotarse et non plus le tiers inférieur, l'inflexion se faisant parfois latéralement vers l'extérieur. Comme les malformations obtenues sont manifestement identiques à celles que donne la semicarbazide, nous ne leur consacrerons pas d'étude tératologique particulière. Les mécanismes de leur formation étant les mêmes, de toute évidence.

VI - ACTION DE L'HYDROXYLAMINE -

A - Pouvoir toxique

L'hydroxylamine serait, selon FISHBEIN et CARBONE (1963), un produit du métabolisme de l'hydroxyurée responsable de l'activité antimitotique de cette dernière substance.

Administrée à 3 jours, elle se révèle extrêmement toxique pour l'embryon de Poulet dont la mortalité survient essentiellement dans les 24 heures qui suivent l'administration du produit. La D.L. 50 se situe au voisinage de 0,003 mg, la D.L. 100, relativement élevée , est de 0,250 mg. environ. Administrée plus tard, sa toxicité tend à diminuer.

.../...

B - Pouvoir tératogène

L'hydroxylamine, administrée à 3 jours, est pratiquement dépourvue de pouvoir tératogène puisque nous n'avons relevé qu'une anomalie sur 66 embryons survivants, représentée par un bec asymétrique, et qui est peut-être spontanée. Son administration ultérieure, entre 6 et 13 jours, entraîne l'apparition plus fréquente de sujets malformés. Ceux-ci présentent alors une brachymélie parfois prononcée, associée dans un petit nombre de cas à des angulations du tibiotarse et du tarsométatarse, résultat qui apparenterait, au premier abord, l'action de ce produit à celui de l'hydroxyurée et de la semicarbazide. Cependant, la fréquence de ces coudures par rapport aux survivants (7/153, soit 4,2%) est du même ordre de grandeur que celles que l'on observe à l'état spontané, mais la brachymélie est anormalement fréquente. Ces constatations permettent de conférer à l'hydroxylamine une faible action tératogène lorsqu'elle est administrée tardivement, mais cette propriété est différente de celle que manifestent la semicarbazide, l'hydroxyurée et l'hydrazine, si l'on prend comme critère les malformations et en particulier la coudure du tibiotarse.

Ces observations ne plaident donc pas en faveur de l'intervention de l'hydroxylamine comme métabolite responsable de l'activité tératogène de l'hydroxyurée.

VII - ACTION DE L'AMINOGUANIDINE -

A - Pouvoir toxique

Quelle que soit sa date d'administration, l'aminoguanidine est une substance peu toxique pour l'embryon puisque la

.../...

T A B L E A U VI

ACTION TERATOGENE DE L'HYDROXYLAMINE

Age d'admn.	Dose en mg.	Nombre d'embryons	Mortalité	Nbre de survivants	Nbre de malformés	% de malformés s/ les survivants
3 j.	0,06	116	54%	53	0	0
	0,100	193	93%	13	1	7,6%
	0,250	95	100%	0	0	-
6 j.	0,006	21	19%	17	3	17,6%
7 j.	0,006	29	7%	27	2	7,4%
10 j.	0,006	25	20%	20	5	25%
12 j.	0,006	19	15%	16	3	18,7%
13 j.	0,012	13	46%	7	3	42,8%

.../...

léthalité à 50% reste à peu près constante entre 10 et 3 mg. de produit par embryon et que la D.L. 100, très élevée, dépasse 50 mg. pour les 15 premiers jours de l'incubation.

B - Pouvoir tératogène

Malgré sa faible toxicité, elle présente un certain pouvoir tératogène qui affecte les sujets traités entre 3 et 6 jours, date à partir de laquelle son action disparaît. Le taux des anomalies se révèle relativement indépendant de la dose car il reste sensiblement constant dans les limites comprises entre 0,500 et 10 mg, particularité qui sépare l'aminoguanidine des autres substances étudiées où la toxicité et la tératogénicité sont proportionnelles à la dose.

Les malformations obtenues intéressent les membres inférieurs qui présentent des ankyloses de l'articulation entre tibiotarse et tarsométatarse, associées ou non à une brachymélie discrète. Nous avons aussi noté deux cas d'exencéphalie dont l'attribution à l'aminoguanidine n'est pas plausible puisque l'anomalie ne s'est plus reproduite par la suite, et peut être considérée comme spontanée, de ce fait. En effet, cette malformation cérébrale est consécutive à un trouble de fermeture du tube nerveux et apparaît antérieurement à la date à laquelle l'aminoguanidine a été administrée.

L'aminoguanidine se sépare assez nettement des quatre premières substances puisqu'elle présente une toxicité et une action tératologique très faibles en particulier [illegible] en ce qui concerne la coudure caractéristique du tibiotarse.

.../...

T A B L E A U VII

ACTION TERATOGENE DE L'AMINOGUANIDINE

Age d'admn.	Dose en mg.	Nombre d'embryons	Mortalité	Nbre de survivants	Nbre de malformés	% de maformés s/ les survivants
3 j.	10	133	34%	87	10	11,4%
	30	29	75%	7	3	42,8%
	50	15	93%	1	1	100%
4 j.	10	50	52%	24	1	4,1%
6 j.	2,5	46	15%	39	2	5,1%
9 j.	5	26	10%	23	0	0

.../...

VIII - ACTION COMPARÉE DE CES DIVERSES SUBSTANCES

Les substances chimiquement apparentées, dont nous venons de discuter l'action tératogène, se divisent à cet égard en deux catégories.

La première comprend l'hydroxyurée, la semi-carbazide et son dérivé soufré. Elle a pour caractère spécifique commun d'affecter le bec et les membres inférieurs qui présentent une coudure caractéristique du tibiotarse. A ce groupe, on peut rattacher l'hydrazine qui est dépourvue d'action sur le bec mais qui conserve les mêmes actions sur le membre que les produits précédents.

La deuxième catégorie comprend l'hydroxylamine et l'aminoguanidine qui ne donnent aucune de ces malformations et qui limitent leur action à la production d'une brachymélie discrète et sporadique parfois associée à des ankyloses.

L'action tératogène de toutes ces substances varie naturellement avec le mode d'administration du produit et l'existence concommittante de processus morphogénétiques susceptibles d'être perturbés.

Le chapitre suivant envisagera les problèmes que pose le mode d'action de ces substances.

C H A P I T R E III

SUR LE MECANISME TERATOGENE DE LA SEMICARBAZIDE

I - ROLE DE L'HISTAMINE ET DE LA SEROTONINE -

A - Action de l'histamine

B - Action de l'histamine associée à la semicarbazide

C - Action de la sérotonine

D - Action de la sérotonine associée à la semicarbazide.

II - LA CARENCE EN VITAMINE B6 -

A - Action de la pyridoxine associée à la semicarbazide

B - Action de la désoxypyridoxine associée à la semicarbazide.

III - ACTION DE DIVERS METABOLITES DE L' A. D. N.

Les substances tératogènes étudiées précédemment, en particulier la semicarbazide, ont en commun la possibilité d'inactiver le phosphate de pyridoxal et de créer ainsi une carence en vitamine B.6. Par voie de conséquence, elles troublent le fonctionnement des enzymes responsables de la synthèse et de la destruction des amines biogènes dont l'histamine et la sérotonine sont les plus importantes, enzymes qui utilisent précisément le phosphate de pyridoxal comme coenzyme. Le problème se pose donc de savoir si ces perturbations vitaminiques sont la source de l'action tératogène de ces produits ou s'il s'agit d'un processus différent affectant directement la synthèse des A.D.N., conformément à ce que l'on sait dans le cas de l'hydroxyurée appliquée aux cellules des sujets adultes.

Dans le chapitre qui suit, nous allons soumettre ces interprétations au contrôle des faits en faisant appel à la semicarbazide, prise comme modèle d'étude, faute de pouvoir envisager le cas de tous les autres corps dotés du même pouvoir tératogène.

A cet égard, nous étudierons d'abord le rôle éventuel de l'histamine et de la sérotonine, puis celui de la vitamine B.6 et de son antivitamine, la désoxypyridoxine.

Enfin, nous envisagerons l'éventualité d'une inhibition directe de la synthèse des A.D.N., rendue vraisemblable par le fait que l'hydroxyurée, on le sait, arrête l'incorporation de la thymidine dans les cellules et empêche la conversion des ribonucléotides en désoxyribonucléotides. Dans cet ordre d'idée et sachant que MOHLER (1966) a observé une atténuation de l'action de l'hydroxyurée par

.../...

la thymidine et que YOUNG, SCHOCHETMAN et KARNOFSKY (1967) ont obtenu une action vicariante similaire dans les cellules cancéreuses de la souche Héla en administrant une combinaison de déoxyadénosine, de déoxyguanosine et de déoxycytidine, nous avons recherché si le pouvoir tératogène de la semicarbazide, identique à celui de l'hydroxyurée, pourrait être atténué par ces mêmes produits.

I - L'histamine et la sérotonine interviennent-elles dans l'action tératogène observée -

Pour répondre à cette question, nous avons examiné l'incidence de ces substances en les administrant séparément ou en les combinant à la semicarbazide afin de voir si elles sont susceptibles de modifier les malformations dûes à ce dernier produit.

A - Action de l'histamine :

L'histamine dont la carence pourrait être mise en cause, manifeste une influence toxique lorsqu'on l'administre à l'embryon de Poulet dans des conditions voisines de celles selon lesquelles ces substances sont appliquées.

La D.L.50 que nous avons renoncé à définir vu la valeur élevée des doses à mettre en jeu pour la fixer, dépasse 1 mg. chez les embryons traités à trois jours, mais les effets toxiques augmentent lorsque l'administration a lieu plus tardivement puisque la D.L.50 est de l'ordre de 0,5 à 1 mg. si l'histamine est appliquée à 9 jours.

.../...

Son pouvoir tératogène est relativement marqué lors d'une administration faite entre 4 et 9 jours, puisqu'il affecte 30% des 110 sujets traités. Il frappe essentiellement le membre inférieur où il se traduit par une brachymélie souvent prononcée. Celle-ci s'accompagne presque toujours d'anomalies des doigts qui se manifestent par une brachydactylie si intense que les doigts sont à peine visibles du fait de leur réduction de taille. Le résultat est lié à des troubles vasculaires entraînant l'apparition de vésicules localisées sur les doigts, remplies de sérosité hématique, et qui sont susceptibles de se rompre en laissant derrière elles des lésions digitales. On observe aussi sporadiquement l'existence de coudures discrètes du tibiotarse dans la proportion affectant 5% des sujets survivants, pourcentage qui correspond au taux de malformations spontanées de la patte, ce qui leur enlève toute signification.

Les malformations données par l'administration d'histamine sont donc différentes pour l'essentiel de celles qui sont communes à la semicarbazide, l'hydroxyurée et l'hydrazine. On peut donc penser que ces dernières substances n'agissent pas en augmentant l'histamine présente dans l'organisme embryonnaire, opinion corroborée par le fait que l'aminoguanidine qui a aussi la propriété d'augmenter le taux d'histamine en empêchant sa destruction, présente également une activité tératogène différente.

B - Action de l'histamine associée à la semicarbazide :

Les expériences que nous avons réalisées sur ce point et qui nous ont livré 61 embryons survivants, montrent que l'action

.../...

tératogène de la semicarbazide n'est pas non plus imputable à l'insuffisance de la production d'histamine que cette substance déclenche.

En effet, l'adjonction d'histamine à la semicarbazide ne modifie pas le pouvoir tératogène de ce dernier produit alors que cela devrait être le cas si l'action tératologique de la semicarbazide était liée à une insuffisance dans la production de cette amine. Au contraire, l'association des deux substances augmente le pourcentage des malformations puisque les anomalies propres à chacune d'entre elles se cumulent, comme c'est le cas lorsqu'on associe deux substances ayant des pouvoirs tératogènes différents.

C - Action de la sérotonine :

La sérotonine est plus toxique que l'histamine, la D.L.50 étant de l'ordre de 0,100 mg. lorsqu'elle est administrée à 3 jours et sa toxicité va en diminuant au fur et à mesure que l'on retarde le moment de l'injection.

Par contre, elle est pratiquement dépourvue de pouvoir tératogène et nous avons seulement noté l'existence sporadique d'une anomalie de position du coeur, moins large et plus allongé qu'à l'état normal, dont la pointe est retournée vers l'extrémité céphalique. Cette perturbation est donc sans point commun avec celles que déclenchent la semicarbazide et les substances apparentées. Nous avons aussi observé un seul embryon porteur d'une coudure du tibiotarse, soit 2% des 50 sujets survivants, taux qui reste dans les limites de fréquence que présente cette malformation à l'état spontané et qui, de ce fait, n'a aucune signification particulière.

On ne peut donc incriminer l'intervention de la sérotonine pour expliquer l'action tératogène de la semicarbazide et des substances apparentées, puisque cette amine ne donne pas de malformations comparables.

D - Action de la sérotonine associée à la semicarbazide :

Comme les résultats antérieurs pouvaient le laisser prévoir, l'adjonction de sérotonine à la semicarbazide ne modifie en rien l'action tératogène de ce dernier produit. Ainsi, sur 44 embryons traités à 9 jours par une dose de 0,250 mg. de semicarbazide employée seule ou associée à la sérotonine, nous avons obtenu, dans les deux cas, le même pourcentage de malformations, toutes caractéristiques de la semicarbazide (50%).

II) - La carence en vitamine B.6. intervient-elle dans l'action tératogène -

Nous venons de voir que l'histamine et la sérotonine ne peuvent être mises en cause pour expliquer l'action tératogène de nos substances et nous allons rechercher maintenant si ces produits, en se combinant avec le phosphate de pyridoxal, déclenchent une carence en vitamine B.6. permettant d'expliquer les malformations observées, les carences vitaminiques pouvant être, on le sait, génératrices d'anomalies biochimiques qui sont tératogènes (TERROINE, 1967).

Nous avons d'abord associé la vitamine B.6. à la semicarbazide pour voir si l'action tératogène de cette dernière

.../...

disparaît sous l'influence d'un tel apport vitaminique. Dans le même ordre d'idée, nous avons ensuite recherché si la désoxypyridoxine, antivitamine B.6. donne des malformations comparables à celles que fournissent la semicarbazide et les autres substances. Enfin, à titre de recoupement, nous avons associé la désoxypyridoxine à la semicarbazide pour vérifier si l'antivitamine peut modifier l'action tératogène du produit.

A - Action de la pyridoxine associée à la semicarbazide :

Pour contrôler les hypothèses énumérées dans le paragraphe précédent, nous avons administré simultanément la semicarbazide et la pyridoxine afin de voir si la vitamine B.6 exerce une action vicariante à l'égard de l'action tératogène du produit.

Les résultats nous ont montré que des doses adéquates de cette vitamine suppriment presque totalement l'action tératogène de la semicarbazide, constatation qui donne à penser, au premier abord, que cette action est liée à la carence vitaminique. On peut toutefois se demander si l'action vicariante de la pyridoxine ne résulte pas simplement d'une combinaison chimique entre la vitamine et la semicarbazide, combinaison qui annulerait les propriétés de cette dernière sans que pour autant intervienne effectivement la compensation d'une carence. La réponse à cette question est donnée par l'emploi de la désoxypyridoxine antivitamine B.6.

B - Action de la désoxypyridoxine associée à la semicarbazide :

Entre les mains de CONTI et MILIO (1965), cette substance

.../...

T A B L E A U VIII

INFLUENCE DE LA VITAMINE B6 & DE SON ANTIVITAMINE
LA DESOXYPYRIDOXINE (D P O X) SUR L'ACTION
TERATOGENE DE LA SEMICARBAZIDE

S C				S C + Vitamine B6				
Nbre d'embr.	Survivants	Malformés	% de malformés	Dose mg.	Nbre d'embr.	Survivants	Malformés	% de malformés
43	36	23	63,9%	0,250 +2,5	50	41	13	31%
				0,250 +5	41	31	4	12,9%
				S C + D P O X				
20	17	10	58%	0,250 +1	55	48	30	62%

.../...

s'est révélée dénuée d'action tératogène spécifique chez l'embryon de Poulet lorsqu'elle est administrée à des doses allant de 0,1 mg. à 1 mg. du début au troisième jour de l'incubation. En effet, les auteurs n'ont pas observé de malformations affectant le membre inférieur et en particulier la brachymélie ou la coudure du tibio-tarse.

Les faits signalés ne sont donc pas en faveur d'une carence vitaminique en pyridoxine comme mécanisme expliquant la genèse des malformations caractéristiques de la semicarbazide et des substances du même type.

Pour notre part et dans l'ordre d'idée précédent, nous avons administré simultanément la désoxypyridoxine et la semicarbazide afin de voir si l'antivitamine aggrave l'action tératogène de ce produit, éventualité qui doit logiquement survenir si la carence en vitamine B.6. intervient dans ces processus tératologiques.

Les résultats obtenus montrent que l'adjonction de l'antivitamine, à la plus forte dose tolérée, ne modifie pas les malformations du bec et des membres déclenchés par la semicarbazide, malformations dont la fréquence et l'importance restent identiques dans les deux cas.

En somme, l'action suppressive de la vitamine B.6 à l'égard de l'action tératogène de la semicarbazide est probablement le résultat d'une combinaison chimique qui modifie la structure de la semicarbazide et par voie de conséquence ses propriétés. Les faits observés montrent donc que l'action tératogène de la semicarbazide n'est pas liée à la carence vitaminique.

.../...

III - Action de divers métabolites de l'A.D.N. sur le pouvoir tératogène de la semicarbazide -

Les résultats négatifs obtenus en prenant pour hypothèse l'intervention soit des amines biogènes, soit de la vitamine B.6, nous ont conduits à envisager la troisième hypothèse exposée plus haut et qui met en cause l'inhibition directe des synthèses des A.D.N. Dans cet ordre d'idée, nous avons alors testé l'action vicariante éventuelle de l'acide orotique et des désoxyribonucléotides comme la thymidine, la désoxyadénosine, la désoxyguanosine et la désoxycytidine qui manifestent une influence protectrice vis-à-vis des cellules de la souche Héla soumises à l'action de l'hydroxyurée. Dans le présent cas, cette influence protectrice éventuelle a été appréciée en prenant comme référence la semicarbazide administrée à des embryons âgés de 9 ou de 10 jours, cette substance et ce stade étant choisis parce qu'ils donnent des manifestations tératogènes caractéristiques sans modifier la mortalité qui reste insignifiante dans ces conditions.

Nous avons d'abord cherché à voir si l'administration d'acide orotique est capable d'atténuer ou de supprimer l'action tératogène de la semicarbazide.

Les expériences réalisées dans ce sens nous ont montré que cet acide n'exerce pas d'effet vicariant à l'égard des malformations que déclenche la semicarbazide tant en ce qui concerne leur nombre que leur gravité.

Il en est de même pour la thymidine dont l'introduction, même en quantité relativement importante n'exerce aucune action

.../...

protectrice vis-à-vis de la semicarbazide probablement parce qu'une carence dans ce désoxyribonucléotide n'est pas le phénomène essentiel mis en cause dans les phénomènes d'inhibition qui frappent la synthèse des A.D.N.

Lorsqu'on associe la thymidine à la désoxyadénosine, à la désoxyguanosine et à la désoxycytidine, on assiste à une diminution faible de l'action tératogène de la semicarbazide, (32% de la malformation) mais l'influence enregistrée est si minime qu'elle ne présente pas de caractère significatif (36% avec la semicarbazide seule et 39% avec la semicarbazide associée à la thymidine).

En somme, les faits observés n'apportent pas une démonstration suffisante que l'activité tératogène de la semicarbazide est dûe à une inhibition de la synthèse des désoxyribonucléotides nécessaires à l'élaboration des A.D.N., explication qui a été proposée dans le cas de l'hydroxyurée appliquée aux cellules adultes. Néanmoins, la complexité des mécanismes mis en jeu dans la synthèse des A.D.N. et qui ne sont pas explorés en totalité par notre schéma expérimental, ne permet pas d'exclure l'hypothèse envisagée, qui reste encore la plus vraisemblable.

CHAPITRE IV

- DISCUSSION DES RESULTATS -

I - LE POUVOIR TERATOGENE ET SES MODALITES

II - MODE D'ACTION DE L'HYDROXYUREE, DE LA SEMICARBAZIDE ET DE L'HYDRAZINE

A - Modification du métabolisme des amines biogènes

B - Carence vitaminique

C - Inhibition de la synthèse des A.D.N.

III - SUR LE MODE D'ACTION DE L'HYDROXYLAMINE ET DE L'AMINOGUANIDINE

IV - CONSIDERATIONS SUR L'EMPLOI DES PRODUITS ETUDIES CHEZ LES MAMMIFERES GESTANTS

Les corps chimiques dont nous venons d'étudier l'activité, posent des problèmes concernant leur pouvoir tératogène, leur mode d'action, ainsi que les incidences posées par leur emploi chez l'Homme.

Nous discuterons ici ces questions pour essayer d'en tirer des conclusions.

I - Le pouvoir tératogène et ses modalités.

Durant la vie embryonnaire, nos substances manifestent des propriétés toxiques et des propriétés tératogènes qui ne sont pas parallèles pour des raisons faciles à comprendre.

En effet, les travaux de P. ANCEL (1950), également réalisés chez l'embryon de Poulet, montrent que ces deux pouvoirs correspondent à deux aspects apparemment contradictoires d'une même activité. La toxicité d'une drogue est liée au fait qu'elle possède une affinité plus grande pour le sang et le coeur que pour les autres ébauches de l'embryon, ce qui entraîne sa mort précoce avant qu'une manifestation tératologique puisse se faire. Par contre, le pouvoir tératogène est dû à ce que l'affinité du produit est plus grande pour une ébauche embryonnaire que pour l'appareil vasculaire. De ce fait, le sujet survit et présente une anomalie organique. Entre ces deux termes extrêmes, tous les intermédiaires s'observent.

Dans notre travail, l'hydroxylamine, l'hydrazine, l'hydroxyurée, la semicarbazide et l'aminoguanidine, se rangent dans un ordre de toxicité décroissant. Par contre, le classement se modifie en ce qui concerne l'activité tératogène. Dans le cas d'une administration des produits à l'embryon de 3 jours, l'hydroxyurée donne le plus de malformations, suivie par la semicarbazide, l'aminoguanidine, l'hydrazine et enfin l'hydroxylamine. L'ordre varie si l'administration du produit est plus tardive. Par exemple, l'hydroxyurée administrée après

.../...

7 jours perd pratiquement son pouvoir sur le membre, tandis que l'hydrazine et la semicarbazide au contraire l'accentuent respectivement jusqu'à 8 et 10 jours et que l'hydroxylamine l'acquiert vers 7 jours. Ces modifications dans les manifestations tératogènes sont apparemment dûes à des changements affectant les paramètres qui conditionnent classiquement la réalisation d'une malformation, à savoir la structure du produit, sa répartition dans l'organisme et enfin la réceptivité des ébauches embryonnaires intéressées.

La structure des substances joue à l'évidence un rôle important dans son activité tératogène comme on le voit en comparant l'hydroxyurée, la semicarbazide et la thiosemicarbazide. En considérant la formule $X = \underset{NH_2}{\underset{|}{C}}-NH \leftarrow Y$ - correspondant aux corps étudiés, on voit qu'il existe des possibilités d'orientation différente de Y par rapport à X, en raison de la libre rotation de la liaison C-N. On peut donc aboutir aux positions extrêmes où X et Y sont soit les plus voisins (cis), soit les plus éloignés (trans).

Lorsque X est représenté par un atome d'oxygène de rayon 1, 36 Å, la rotation est aisée comme c'est le cas de l'hydroxyurée et de la semicarbazide. Ceux-ci peuvent donc adopter aisément les configurations convenant respectivement aux récepteurs mis en jeu dans les manifestations de la patte et du bec.

Par contre, la libre rotation devient difficile lorsque X est un atome de soufre de rayon 2,02 Å comme c'est le cas de la thiosemicarbazide qui possède alors des conformations interdites expliquant la diminution de son activité par rapport à la semicarbazide.

La répartition de la substance ou de ses dérivés actifs représente également un paramètre important comme le montrent les variations

du pouvoir tératogène de l'hydroxyurée au niveau de la face, ce pouvoir disparaissant lorsque le produit est administré à l'embryon à 5 jours. En effet, au delà, les bourgeons maxillaires et nasaux se fusionnant à 6 jours, les délais entre l'administration du produit et la fusion des ébauches sont trop courts pour que la substance ou son dérivé actif présente une répartition qui lui permette d'atteindre en quantité suffisante les ébauches intéressées et d'inhiber leur fusion. Par contre, la semicarbazide a une répartition plus rapide puisqu'elle agit moins d'un jour après son administration.

On peut rattacher au problème de la répartition, les phénomènes d'inactivation des produits qui expliquent également les variations de leur pouvoir tératogène, en particulier dans le cas de la semicarbazide et de l'hydroxylamine. Ainsi, administrée à 5 jours, la semicarbazide ne donne de coudure du tibiotarse, qu'à condition d'être appliquée à dose élevée. Par contre, elle se montre active à dose cinq fois plus faible lorsqu'elle est donnée à 10 jours. Cette différence s'explique certainement par le fait que dans le premier cas la plus grande partie du produit est inactivée entre 5 et 10 jours, âge où l'effecteur présente sa sensibilité à l'agent. Ce n'est pas le cas lorsque le produit est administré à 10 jours.

Le dernier paramètre, représenté par la réceptivité des ébauches, joue également un grand rôle dans les manifestations tératogènes. En effet, si l'on tient compte du fait que l'ossification diaphysaire du tibiotarse de la patte se produit tard dans l'incubation, on comprend que la semicarbazide , l'hydroxyurée et l'hydrazine puissent exercer leur pouvoir tératogène pendant toute la première moitié de l'incubation, ce qui n'est pas le cas pour la face dont la formation est plus précoce.

.../...

En tenant compte des paramètres précédents et qui sont susceptibles de modifier les manifestations tératologiques, on peut diviser en deux catégories les substances étudiées ici du point de vue tératogène. La première comprend l'hydroxyurée, la semicarbazide et l'hydrazine dont les pouvoirs tératogènes sont voisins. La seconde catégorie groupe l'hydroxylamine et l'aminoguanidine dont les propriétés sont différentes des précédentes.

II - Mode d'action de l'hydroxyurée, de la semicarbazide et de l'hydrazine.

Ces produits ont la propriété d'inhiber le métabolisme de la sérotonine et de l'histamine mises en cause dans la mitose, de créer une carence en vitamine B6, et d'inhiber la synthèse des A.D.N.

Nous allons essayer de voir laquelle de ces propriétés explique leur pouvoir tératogène.

A - Modifications du métabolisme des amines biogènes.

On sait que la semicarbazide et l'hydrazine sont susceptibles de perturber la production de l'histamine et de la sérotonine en bloquant les décarboxylases qui leur donnent naissance. Ce mode d'action est lié au fait que ces produits se combinent au phosphate de pyridoxal, coenzyme des décarboxylases. Par contre, l'hydroxyurée n'est pas signalé comme possédant cette propriété, mais selon certains auteurs, elle libère de l'hydroxylamine qui en est dotée. Or, ces amines, on le sait, peuvent troubler la division cellulaire et par cette voie, léser les ébauches embryonnaires.

Nos expériences montrent qu'une chute du taux de ces amines ne joue pas de rôle appréciable dans les manifestations tératogènes observées, puisque l'administration d'histamine ou de sérotonine, même à forte dose, n'influence pas l'action tératogène des substances envisagées.

.../...

Paradoxalement, on sait que la semicarbazide et l'hydrazine inhibent également les aminoxydases qui détruisent les amines. Une liaison entre cette propriété et l'activité tératogène ne doit pas non plus être retenue puisque l'aminoguanidine qui présente également cette activité, entraîne des malformations d'un type tout différent. On trouve un argument supplémentaire à l'appui de ces conclusions dans le fait que l'histamine et la sérotonine, administrées seules, même à forte dose, entraînent d'autres malformations que celles qui sont données par les produits étudiés.

En somme, l'action tératogène que présentent la semicarbazide et les substances apparentées, n'est pas dûe à l'influence de ces produits sur le métabolisme des amines biogènes.

B - Carence vitaminique.

On sait aussi que la semicarbazide, l'hydrazine et l'hydroxyurée, par la voie de l'hydroxylamine qui est son dérivé, se combinent avec le phosphate de pyridoxal et l'on doit donc se demander si les malformations obtenues sont la conséquence de l'avitaminose B6 ainsi déclenchée et à laquelle les Oiseaux adultes sont sensibles.

En apparence, un argument à l'appui de cette hypothèse est apporté par le fait que l'administration de pyridoxine (vitamine B6) supprime l'activité tératogène de la semicarbazide, constatation qui n'est cependant pas décisive puisque la combinaison entre la vitamine B6 et la semicarbazide peut supprimer l'action de cette dernière simplement en modifiant sa configuration chimique et non pas en restaurant le taux de la vitamine.

L'exactitude de cette dernière interprétation est démontrée par le fait que la carence vitaminique déclenchée par la désoxypyridoxine, antivitamine B6, n'entraîne pas de conséquence tératologique

.../...

chez l'embryon de Poulet, ainsi que Conti & Milio (1965) l'ont déjà signalé et comme nous l'avons vérifié nous mêmes. Par ailleurs, l'adjonction de cette même antivitamine n'aggrave pas l'activité tératogène de la semicarbazide comme ce devrait être le cas si cette dernière substance agissait par un effet de carence.

L'ensemble de ces faits donne à penser que l'activité des substances étudiées n'est pas liée aux troubles vitaminiques qu'elles déclenchent, pas plus qu'elle n'était liée aux troubles affectant les amines biogènes.

C - Inhibition directe de la synthèse des A.D.N.

Parmi les trois substances envisagées ici, seule l'action de l'hydroxyurée sur la synthèse des A.D.N. est connue par les travaux antérieurs effectués, tant sur les cellules cancéreuses que sur les cellules normales. Leurs résultats montrent que l'hydroxyurée agit essentiellement sur la synthèse des A.D.N. en empêchant l'incorporation de la thymidine et la transformation des ribonucléotides en désoxyribonucléotides. Compte tenu du fait que nous avons éliminé précédemment les autres explications possibles, cette interprétation nous paraît s'appliquer au mode d'action tératogène non seulement de l'hydroxyurée, mais aussi de la semicarbazide et de l'hydrazine qui présentent les mêmes propriétés.

Le fait que l'administration de précurseurs des A.D.N., tels que l'acide orotique, la thymidine et les désoxyribonucléotides, ne manifeste pas d'effet vicariant à l'égard de l'action tératogène de la semicarbazide, ne nous paraît pas une objection suffisante pour rejeter cette interprétation. En effet, il est vraisemblable que l'action tératogène de nos substances est liée à un maillon de la synthèse très complexe des A.D.N. qui n'est pas en rapport avec les précurseurs étudiés ici. L'interprétation nous paraît la plus vraisemblable et permet d'expliquer les malformations observées.

.../...

En effet, nous avons montré que les troubles initiaux déclanchés par la semicarbazide et par les substances voisines sont dûs à une insuffisance de l'os périostique lié à une carence en osséine et en sels calciques, ossification qui est l'oeuvre des ostéoblastes agissant suivant un mécanisme enzymatique complexe.

Par ailleurs, des travaux récents montrent que l'A.D.N. nucléaire contrôle l'élaboration des enzymes cellulaires grâce à l'intervention conjointe des acides ribonucléiques, en particulier de l'A.R.N. messager, véhicule du code génétique contenu dans les A.D.N. et dont la synthèse est sous la dépendance directe de ces derniers. L'ostéoblaste ne fait pas exception à ce mécanisme, et on comprend qu'une perturbation de la synthèse de ses A.D.N. amène une inhibition de ses activités enzymatiques, inhibition qui affecte en particulier la production d'osséine et les dépôts calciques.

Sur la base de cette interprétation, il reste à comprendre les raisons pour lesquelles la malformation osseuse se situe au niveau du tibiotarse, puisque les examens pratiqués avant l'apparition de la coudure révèlent des lésions osseuses affectant indistinctement tout l'os périostique et que ce n'est donc pas une lésion en un point précis qui est à l'origine de cette localisation. En fait, cette dernière dépend d'un facteur indépendant du mécanisme cytologique puisqu'il est représenté par la traction des muscles prédominants de la patte.

L'action convergente d'un trouble ostéoblastique et d'un dispositif anatomique est donc responsable de la malformation considérée.

Les autres anomalies osseuses intéressant le membre inférieur ou la mandibule, se produisent suivant des mécanismes analogues.

Le bec de lièvre et l'atrophie des paupières que donne l'hydroxyurée ne dépendent plus d'un trouble de l'ossification, mais on

peut penser que l'antimitotique, en bloquant la synthèse de l'A.D.N. inhibe l'activité cellulaire des bourgeons correspondants de la face dont l'évolution est arrêtée. Dans ce cas, la localisation de la malformation est dûe à l'affinité de l'antimitotique pour ces ébauches à un moment où la morphogenèse normale exige une multiplication cellulaire correcte.

III - Considérations sur le mode d'action de l'hydroxylamine et de l'aminoguanidine

Ces deux produits présentent un pouvoir tératogène faible, différent des précédents, et se limitant à la production sporadique d'une brachymélie, ce qui nous a amené à les classer à part. Néanmoins, leurs propriétés apportent des éclaircissements concernant l'action de l'autre groupe, raisons pour lesquelles nous les avons employées.

En premier lieu, leur emploi met hors de cause l'intervention de l'histamine comme agent tératogène puisque ces deux produits qui agissent également sur les amines, donnent des résultats différents de ceux que fournissent les substances du premier groupe.

En second lieu, la faible action tératogène de l'hydroxylamine l'exclut comme métabolite responsable des malformations dûes à l'hydroxyurée, contrairement à l'opinion de FISHBEIN et CARBONE (1963) et des auteurs à leur suite.

IV - Considérations sur l'emploi des produits étudiés chez les Mammifères gestants

Compte tenu du fait que l'hydroxyurée est tératogène chez l'embryon du Rat et du Hamster, on peut logiquement penser que la semicarbazide et l'hydrazine qui possèdent les mêmes propriétés tératogènes que l'hydroxyurée chez l'embryon de Poulet, possèdent également une activité similaire chez les Mammifères et chez l'Homme. Il

en est de même pour l'aminoguanidine et l'hydroxylamine. L'emploi de ces produits ou de leurs dérivés comme antimitotique ou comme régulateur des amines biogènes est donc à proscrire à priori pendant la grossesse, à moins d'assurance contraire assise sur une expérimentation réalisée chez les Mammifères.

CONCLUSIONS AND REMARKS

I - Nous avons étudié l'action tératogène de substances récemment introduites en carcinologie pour leur activité antimitotique en nous adressant à un vertébré amniote, en l'occurence l'embryon de Poulet.

Trois de ces produits, à savoir l'hydroxyurée, la semicarbazide et la thiosemicarbazide présentent une parenté de structure chimique. L'hydroxylamine, considérée comme un métabolite actif de l'hydroxyurée, a été aussi envisagée pour cette raison.

Enfin, à titre comparatif, l'hydrazine et l'aminoguanidine ont été également étudiées du fait que ces produits partagent avec les substances précédentes la propriété d'intervenir dans le métabolisme des amines biogènes, mécanisme dont l'intervention éventuelle dans les propriétés tératogènes des quatre premiers produits s'est révélée utile à préciser au cours du travail.

II - Au point de vue de leur toxicité sur l'organisme embryonnaire l'hydroxylamine, l'hydrazine, l'hydroxyurée, la semicarbazide, son dérivé soufré et l'aminoguanidine présentent une activité décroissante.

III - Ces corps présentent également une activité tératogène qui n'est pas parallèle à leur toxicité et dont les effets varient avec la phase du développement embryonnaire au cours de laquelle ces produits sont administrés, phénomène classique en tératologie.

Ainsi, en cas d'application précoce, l'hydroxyurée, la semicarbazide, son dérivé, l'aminoguanidine, l'hydrazine et l'hydroxylamine manifestent un pouvoir décroissant. Mais le classement se modifie lorsque l'administration est tardive, la semicarbazide et l'hydrazine se classant alors en tête.

.../...

IV - Les malformations obtenues permettent de classer les substances considérées en deux catégories. La première comprend l'hydroxyurée, la semicarbazide et son dérivé soufré qui ont pour caractère commun d'affecter le développement de la face et des membres inférieurs lesquels présentent alors une coudure typique du tibiotarse. A ce groupe se rattache l'hydrazine qui présente la même action sur le membre mais qui est dépourvue d'action sur le bec.

La deuxième catégorie groupe l'hydroxylamine et l'aminoguanidine qui donnent seulement une brachymélie discrète mais aucune des malformations précédentes.

Les mécanismes morphogénétiques déclenchés par les substances du premier groupe, en particulier la semicarbazide ont été étudiés sur le membre inférieur où se manifeste l'anomalie la plus fréquente. A ce niveau, il s'agit essentiellement d'une inhibition quantitative et qualitative de l'ossification périostique du tibiotarse. Elle entraîne alors une moindre solidité de la pièce squelettique qui s'incurve sous l'influence des muscles prédominants. Des explications sont également données pour les anomalies de la face.

V - Nous avons essayé de préciser les mécanismes tératogènes mis en cause en nous adressant plus spécialement à la semicarbazide. Comme cette substance partage avec les précédentes la propriété d'inactiver le phosphate de pyridoxal, nous avons cherché à voir le rôle de la carence en vitamine B6 ainsi créée. Par ailleurs, comme cette carence trouble en particulier le fonctionnement des enzymes qui sont à la source des amines biogènes dont l'histamine et la sérotonine sont les plus importantes, nous avons aussi envisagé le rôle de ces amines.

Les expériences réalisées pour contrôler ces hypothèses de travail nous ont montré que la carence vitaminique n'est pas la source des propriétés tératogènes observées.

.../...

Elles ont également montré que l'on ne pouvait pas non plus incriminer un trouble du métabolisme des amines considérées puisque ces substances prises isolèment ou en association avec la semicarbazide n'entraînent aucune malformation comparable avec ce qui se voit au niveau de la patte. De plus, l'aminoguanidine qui intervient également dans le métabolisme des amines n'offre pas non plus d'activité de ce type.

VI - Ces résultats négatifs nous ont amené à adopter une autre hypothèse mettant en cause une action inhibitrice directe de ces produits sur la synthèse des A.D.N. Cette opinion est fondée sur le fait que l'hydroxyurée manifeste ce type d'action sur les cultures de cellules des vertébrés adultes, inhibition qui peut être d'ailleurs levée par l'action vicariante de désoxyribonucléotides administrés simultanément. Les expériences réalisées à partir de ces données ne nous ont pas permis de trancher la question mais cette interprétation nous paraît quand même représenter l'explication la plus satisfaisante en ce qui concerne l'action de l'hydroxyurée, de la semicarbazide et de l'hydrazine qui représente l'essentiel de nos investigations en ce qui concerne ce travail tératologique . Un schéma explicatif est proposé en ce qui concerne les rapports pouvant unir le blocage de la synthèse des A.D.N. et les anomalies constatées.

VII - L'attention est attirée sur les risques tératologiques que les produits considérés peuvent éventuellement faire courir à l'espèce humaine.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ADAMSON R.H., AGUE S.L., HESS S.M. et DAVIDSON J.D.-
  The distribution, excretion and metabolism of hydroxyurea C^{14}.
  J. of Pharmacol. exp. Therap., 1965, 150, 3[illegible]-3[illegible]7.

- ALTMAN P.L. et DITTMER D.S.-
  Biology data book.
  I Vol. Feder. of Amer. Soc. exp. Biol., 1964, I-633.

- ANCEL P.-
  La Chimiotératogénèse chez les Vertébrés.
  I Vol., 1950, G. DOIN.

- BODIT F., STOLL R. et MARAUD R.-
  Action de l'hydroxyurée, de la semicarbazide et de substances voisines sur le développement de l'embryon de Poulet.
  C.R. Soc. Biol., 1966, 160, 960.

- BORENFREUND E., KRIM M. et BENDICH A.-
  Chromosomal abberrations induced by hyponitrite and hydroxylamine derivatives.
  J. of Nat. Cancer Inst., 1964, 32, 667-679.

- BRUNORI M., FLORIDI A., CAPUTO A. et GIULANO R.-
  Antitumoral action of new sarcomycin derivates.- II. Importance of the thiosemicarbazone group.
  Oncologia, 1966, 20, 99-112.

- BUCHER T. et SIES H.-
  Inhibitors tools in cell research.
  I Vol. 1969, I-415, Springer, Berlin.

- CALDARERA C.M., BARBIROLI B. et MORUZZI G.-
  Polyamines and nucleic acides during development of the chick embryo.
  Biochem. J., 1965, 97, 84-88.

- CHAUBE S. et MURPHY M.L.-
  The effects of hydroxyurea and related compounds in the rat foetus.
  Cancer Res., 1966, 26, 1448-1457.

- [illegible].-
Inhibition of aminoacide decarboxylases.
in "Metabolic Inhibitors", 2 vol., I963, 339-346, HOCHSTER R.M. et [illegible] J.H.

- CL[illegible]NT F.-
La méthylhydrazine dans le traitement du myélome multiple et de la maladie de Hodgkin.
Schweiz. Med. Wschr., I965, 95, I43I-I434.

- C[illegible]LL[illegible], Jr.-
Inhibition of growth of mouse tumors by injections of serotonin or serotonin and histamine combined.
Cleveland Clin. Quarterly. I966, 33, 25-29.

- DECK J.D. et [illegible]N S.L.-
Retardation of the new limb regeneration with semicarbazide, an inhibitor of histmain formation.
Ann. Rec., I963, I46, 225-233.

- DOLLANDER A. et MARCONNET R.-
Action de l'urée sur le développement embryonnaire de Pleurodeles Waltii.
C.R. Ass. Anat., I954, 40, 892.

- DOLLANDER A., MARCONNET R. et AUTELIN R.-
Action comparée de différentes doses d'urée sur le développement de l'embryon de Poulet.
C.R. Soc. Biol., I956, I56, 690.

- DUVAL M.-
Atlas d'embryologie.
I Vol., I889, MASSON, Paris.

- ERDMANN.-
I940. Cité d'après ROMANOFF I960.

- FAUTREZ J.-
I95I. Cité d'après DOLLANDER et MARCONNET I964.

- FERM V.H.-
Teratogenic activity of hydroxyurea.
Lancet, I965, I2, I338-1339.

- FERM V.H.-
Severe developmental malformations. Malformations induced by urethane and hydroxyurea in the Hamster.
Arch. of Pathol., I965, 80, I74-I77.

- FISHBEIN W.N. et CARBONE P. .-
Hydroxyurea ; Mechanism of action.
Science, 1963, 142, 1069-1070.

- GAL G.J., KELDILL S.M., Mc LAIN H.H. et DUBOIS S.-
Effect of hydroxyurea on Pseudomonas aeruginosa.
Cancer Res., 1964, 24, 1117-1119.

- JENKINSON J.W.-
On the effect of certain solutions upon the development of the Frog egg.
Arch. f. Entw. Mech., 1906, 21, 367.

- KAHLSON G. et ROSENGREN E.-
Prevention of foetal development by enzymes inhibition.
Nature, 1959, 184, 1238-39.

- KAHLSON G.-
New approaches to the physiology of histamine.
Persp. in Biol. and Med., 1962, 5, 179-197.

- KIHLMAN B.A.-
Actions of chemicals on dividing cells.
I Vol., 1966, Prentice-Hall.

- LE-BLANC J.L., HUOT L. et CORRIVAULT W.-
A possible role for histamine in larval growth.
Experientia, 1962, 18, 30-32.

- MARSHALL A.J.-
Biology on comparative physiology of birds.
2 Vol., 1960. Acad. Press.

- MAZIA D.-
Mitoses and the physiology of cell divisions.
in "The Cell", Tome III, 1961, Acad. Press, 77-423.

- MICHAELIS A., SCHUBRICH J. et RIEGER R.-
Chromosomenabberrationen bei Vicia Baba und Ascitestumoren der Maus nach Einwirkung von N. Nitroso-N-Methylharnstoff.
Chromosoma, 1965, 16, 191-123.

- MINICH S. et NICHOL C.A.-
Antitumor effects of methylglyoxal bis (N^4-methylthio-semicarbazone) and their potentiation in pyridoxine deficient animals.
Cancer Res., 1965, 25, 794-801.

- MOHLER W.C.-
Cytotoxycity of hydroxyurea (N.C.S. 32065) reversible by pyrimidine deoxyriboside in a mammalian cell line grown in vitro.
Cancer Chemoth. Rep., 1966, 1564.

- MURPHY M.L. et CHAUBE S.-
Preliminary survey of hydroxyurea ([illegible]) as a teratogen.
Cancer Chemoth. Rep., 1964, [illegible], I-7.

- [illegible] J.J. et FISHBEIN W.N.-
Induction of chromosome breaks in cultured normal human leukocytes by potassium arsenites, hydroxyurea and related compounds.
Cancer Res., I965, 25, 98-[illegible].

- [illegible] S.B. et [illegible] L.L.-
Inhibition of D.N.A. synthesis in Hela cells by hydroxyurea.
Cancer Res., [illegible], 27, I[illegible]-I[illegible].

- PHILIPS F.S., STERNBERG S.S., SCHWARTZ H.S., CRONIN A.P., [illegible] et VIDAL [illegible].-
Hydroxyurea. I.- Acute cell death in proliferating tissues in rats.
Cancer Res., I[illegible]7, 27, 6I-74.

- [illegible].-
Mechanism of antimitotic and antitumor action of 5 hydroxytryptamine (serotonin).
Acta Un. Int. Cancer, I[illegible], [illegible], I[illegible]I-I[illegible].

- R[illegible]NKO G.I.-
The influence of serotonin and sarcolysin on the nucleic acid concentration in the blood and sarcoma H5 tissue of Rats.
Vop. Onkol., [illegible], I[illegible], 6[illegible]-6[illegible].

- ROMANOFF A.-
The Avian Embryo. I960, I Vol., [illegible].

- SCHINZ H.R. et ZAGERL [illegible].-
I937, cité d'après ROMANOFF, I96[illegible].

- SCHMALHAUSEN I.-
Studien über Wachstum und Differenzierung. III. Die embryonale Wachstumkurve des Hühnchens.
Arch. f. Ent., Mech., I926, I08, 325.

- SCHWARTZ H.S., GARLEAN M., STERNBERG S.S. et PHILIPS F.S.-
Hydroxyurea : Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in regenerating liver of rats.
Cancer Res., I[illegible], [illegible], I[illegible]67-I[illegible]7[illegible].

- SINCLAIR W.K.-
Hydroxyurea : Differential lethal effects on cultured mammalian cells during the cell cycle.
Science, I965, I50, I7[illegible]9-I73I.

- SINCLAIR W.K.-
Hydroxyurea : effects on chinese hamster cells grown in culture.
Cancer Res., I967, 27, [illegible].

- [illegible]
[illegible] biochimiques et avitominoses tératogènes.
[illegible] biologique, 7, 329-359.

- [illegible]
The cytoplasm of Protozoa.
in "The Cell", tome IV, [illegible], Acad. Press, [illegible].

- TURNER M.K., ABRAMS R. et LIEBERMAN I.-
Meso X S diphenylsuccinate and hydroxyurea as inhibitors of dexycytidilate synthesis in extracts of Erlich ascites and L. cells.
J. Biol. Chem., [illegible], 24I, 5777-5780.

- VOGLER W.R., [illegible] et HUGULEY G.M. Jr.-
In vivo effect of hydroxyurea on orotic acid synthesis.
Cancer Res., [illegible], [illegible], I827-I83I.

- YARBRO J.W., [illegible] et BARNUM C.P.-
Hydroxyurea inhibition of D.N.A. synthesis in ascites tumor.
Proceedings of Nation. Acad. of Science, I965, 53, [illegible].

- YARBRO J.W.-
Hydroxyurea and mythramycin in inhibition of nucleic acid synthesis in mouse ascites tumor as measured by radiosphorus incorporation.
Dissertation abstract [illegible] in Bull. [illegible], I967, I5, [illegible], I8.57.

- YOUNG C.W. [illegible].-
Hydroxyurea : inhibitory effect on D.N.A. metabolism.
Science, [illegible], I46, [illegible].

- YOUNG C.W., SCHOCHETMAN G. et [illegible].-
Hydroxyurea : induced inhibition of deoxyribonucleotid synthesis : studies in intact cells.
Cancer Res., I967, 27, 526-53[illegible].

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

N.B. - La bibliographie a été arrêtée en 1968, date de début de la rédaction du texte. Depuis lors la lecture de "Advances in teratology", Logos press Londres, 1969-1970, ne nous a pas fourni de documents nouveaux sur les problèmes étudiés.